



**Consejo Superior de
Investigaciones Científicas**



Departamento de Nutrición Vegetal
Estación Experimental de Aula Dei
Zaragoza

Tesis Doctoral

**Regulación de la expresión de antioxidantes y hemoglobinas de
Lotus japonicus en respuesta a estrés y hormonas**

Memoria presentada por

Dña María del Pilar Bustos Sanmamed

Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor

Zaragoza, Septiembre, 2010

D. Manuel Becana Ausejo, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Regulación de la expresión de antioxidantes y hemoglobinas de *Lotus japonicus* en respuesta a estrés y hormonas” ha sido realizada por la Licenciada Dña. M^a del Pilar Bustos Sanmamed en el Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) bajo mi dirección y reúne, a mi juicio, las condiciones para optar a Grado de Doctor.

Zaragoza, Septiembre de 2010

Dr. Manuel Becana Ausejo

*A mis padres,
a Miguel
y a Roberto*

*A todos nos gusta que lo bueno dure siempre,
pero luego dura lo que tiene que durar,
normalmente, más de lo debido.
(Doctor Deseo)*

Agradecimientos

Paulo Coelho decía en su novela *El Alquimista* que “cuando quieres una cosa, todo el Universo conspira para ayudarte a conseguirla”.

Hace cuatro años que llegué a la Estación Experimental de Aula Dei. Por aquel entonces quería dar mis primeros pasos en el mundo de la Ciencia. Durante esos cuatro años muchos sois los que me habéis acompañado en mi aprendizaje, animándome a levantar cuando caía y alentándome a seguir cuando avanzaba y pisaba firme. Esta Tesis es el resultado de esos primeros pasos que me habéis ayudado a dar; por eso, esta Tesis es fruto de vuestro apoyo, ayuda y compañía y, ahora que tengo la oportunidad, quiero daros las gracias a todos por todo:

A mi director de Tesis, el Dr. Manuel Becana, por confiar en mí para realizar el doctorado en su grupo.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación, por financiar estos cuatro años con una beca FPI (ref. BES-2006-12165), asociada al proyecto AGL2005-01404.

Al CSIC y, en especial a la Estación Experimental de Aula Dei, por abrirme sus puertas para realizar mi trabajo de Tesis.

A mis compañeros de laboratorio, “cafetazos” y huevos con chorizo (o pechuga de pollo) en el Casino: a Carmen por ser la pieza clave del grupo, por ser la mejor técnico pero, sobre todo, por su calidad humana y por ayudarme a sobrellevar mi intolerancia a los pasteles y cremas; a Javier Ramos porque, a pesar de que por fuera parece frío y distante, he tenido el privilegio de conocerle verdaderamente, gracias, Javierín, por nuestras conversaciones surrealistas a la par que interesantes; a Alejandro (mi querido Tovarish), cuyos consejos, ayuda y ánimos han sido fundamentales en este último año de Tesis. Gracias por tan buena “onda”, intentaré seguirla siempre. A María, nunca olvidaré nuestras conversaciones en la sala de residentes del Colegio de España durante mi primera estancia en París; a Ana, que tiene la gran suerte de trabajar con Manu, el mejor director de Tesis que se puede tener, disfruta; a Marthita, quien por su carácter es, oficialmente, mi “heredera”. Te dejo dos duras misiones: “conseguir que Javierín asiente la cabeza” y “que el grupo Becana no vuelva a perder a los bolos contra los Abadía”. Y a mis dos “meditadores”, los más despistados, Joaquín y Manu (mi siempre admirado e idolatrado Dr. Matamoros), a quienes les podría escribir miles de páginas para agradecerles TODO: por ser los mejores compañeros que se puede tener, capaces de hacer divertido cualquier momento banal del día, de escuchar, de dar consejos y, sobre todo, de hacerme sentir especial. Gracias por vuestra amistad y vuestro cariño. Enhorabuena por el trabajo realizado en mi educación. Sé que nunca os lo puse fácil pero, para que veáis que en algo ha dado resultado, simplemente deciros: siempre seréis mis preferidos, incluso por encima de Rescue y Mayo, que nunca conseguirán haceros sombra aunque, en las cenas de Navidad, a las 12 os convirtáis en “guisantes”.

A toda la gente del departamento de Nutrición Vegetal. Especialmente a las chicas del laboratorio Picorel: Vanesa (por su constante ayuda, sobre todo en los últimos meses), Marian, Patricia, Bea, Sara, Sara López... porque no habría sido lo mismo sin vosotras y vuestra gran capacidad para organizar eventos. Gracias a la gente del grupo Abadía: Aurora, Irene, Rubén, Ade, Ruth (capaz de transmitir su constante buen humor en cualquier circunstancia), Hamdi y Giusepe (siempre dispuestos a escuchar), Jorge (por su capacidad para hacerme reír en todo momento), y como no, Saúl (por su gran paciencia aderezada con una constante sonrisa. Por cierto: ¿de qué parte de Madrid eres?). Gracias a todos por los buenos ratos *tupper-ware*, picoteos, bodega de “el general” y catas de cervezas que he compartido con vosotros. A Victoria porque, sin duda, su capacidad de esfuerzo y trabajo es un gran ejemplo para los que la conocemos, gracias por los consejos y por abrirme las puertas de tu casa.

Gracias a la gente de otros departamentos. A David Moret, espero que no cambies nunca y nos vemos en las calles; a Manuel, Leticia, Juan y Nuria por su simpatía; a Sergio, el único *postdoc* con la capacidad de aguante de un *predoc*, porque desprende alegría allá por donde pasa, y ha sido un placer tenerle cerca; a Laura, por su constante cariño. Espero que disfrutes mucho de tu “nueva vida”, vas a ser una gran mamá. A Natalia, una de las personas que mejor me ha entendido, gracias por tu apoyo y, sobre todo, gracias por tu amistad.

Y, después de tantos ratos juntos, llega un momento en el que, con algunas personas, no convives, sino vives. Miren, poco tengo que decir que no sepas ya. Muchas veces, cuando compartíamos piso, hablábamos de la gran frase que resumiría nuestra Tesis. Cuando la he tenido que buscar ha sido imposible, elegiría una u otra según el momento. Sin embargo, hace un tiempo leí en la novela *Rebelión en la granja*, de George Orwell, algo que cobra especial significado en ti: “Si la libertad significa algo, es el derecho a decirles a los demás lo que no quieren oír”. Loreto, hemos reído, hemos llorado, hemos trabajado codo con codo, hemos atravesado España y Francia juntas, hemos conquistado París... gracias por todos estos momentos. Sólo espero seguir llenando capítulos de la historia junto a mi gran amiga Loretín. Y recuerda: “el tiempo suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades” (Miguel de Cervantes).

Gracias al Institut des Sciences du Végétal (Gif-sur-Yvette) y, especialmente, al Dr. Martin Crespi por haber sido responsable de dos de los mejores momentos de mi Tesis, las estancias en el extranjero. Gracias Martin por acogerme y hacer que desde el primer día me haya sentido una más de la gran familia MC-FF, lo mejor de París está sin duda en el ISV. Martin, Christine, Florian, Caroline, merci pour me montrer que la science de haut niveau est compatible avec la meilleure qualité humaine. Christine, merci pour ta gentillesse, ta patience, pour toujours avoir du temps pour m’aider. Merci Julie, Marie, Élodie, Damien, Malo, Gabrielle, Mickeal, Lucas, Vincent, Philippe, Steffi, Sébastien, Anouck (“la rubia guapa” ne perds jamais ton bon humour, c’est unique, tu es unique), Ons (c’est génial de rencontrer quelqu’un qui sourit à chaque instant même

si ce n'est pas un bon moment), Axel (il n'existe pas assez de mots pour te remercier pour tout, tu es l'amitié en personne), Florian B et Khan ("les petits batards", je me suis bien amusée avec vous, vous êtes géniaux), Marie Bourcy (tu portes le bonheur), Olivier (comme tu dis "la vraie amitié c'est pour toujours"), Misha (благодарю тебя за наши разговоры и твое время), Paulina (la historia no acabó, nos quedan muchos momentos que vivir con Loreto), Jose y Astrid (por nuestros ratos "españoles")... Merci pour tous les bons moments et on se trouve bientôt parce que "s'il faut, il faut".

Sin duda, París es una ciudad fantástica, pero cualquier ciudad del mundo sería la mejor si en ella estuviesen los dos argentinos más maravillosos, Fede y Gustavo. Desde el primer día ocupáis un lugar especial en mi corazón. Gracias por una amistad tan linda como la vuestra.

Gracias a todas las personas que conocí en el Colegio de España de París (Diego, Nacho, Eva, Javi, Jovi, Chema, Raquel, Sergio, Jaime...), por hacerme sentir como en casa. Gracias, muy especialmente a mis amigos: Sergio Tatay (por ser como eres, por cuidarme, por tus consejos y ayuda, por esas cervezas en el "bar de enfrente", por nuestras carreras por Montsouris...); Neus (capaz de convertir cualquier palabra en una herramienta para hacer humor inteligente, de saber lo que pienso sin necesidad de hablar) y, Betlem (la bondad en persona), gracias a Neus y a ti por nuestras conversaciones y momentos "vishte" en la cocina pequeña de la 4ª. Vuestra amistad fue un gran regalo que traje de París. Sólo deciros: "siempre nos quedará París".

Gracias a los que me enseñasteis que la Ciencia es apasionante, pero que fuera el mundo es aún mejor. A Eva (por su buen humor que es el mejor ejercicio para los músculos de la cara, mejor que cualquier tabla de abdominales), espero que sigas siempre igual; a Lola, por su amistad, por escucharme, por apoyarme y por esos momentos, ojalá se repitan muchas veces, de "русские пива"; a Marta "моя самая хорошая подруга", contigo no tengo palabras (ni en ruso, ni en castellano) para darte las gracias por todo, gracias por enseñarme que, en esta vida, es mejor "redondear" para llegar a un sitio, ya que lo que encuentras en el camino es, en ocasiones, más importante que lo que hay al final de él.

A mis profesores de la Universidad de Salamanca, Dolores Rodríguez (Lola) y Oscar Lorenzo, por su interés y confianza en mí. Gracias porque me alentáis constantemente a seguir. Gracias de corazón a Fernando Leal por su apoyo y ánimos, por enseñarme que la ciencia contribuye al progreso y al aprendizaje pero nunca hay que olvidar su lado práctico y divertido. A Héner Valdivieso, por ayudarme en mis comienzos en un laboratorio.

Gracias a los de "toda la vida", los que me conocen desde hace tiempo y han decidido seguir a mi lado. A mis amigas de la Universidad: Marta, María, Inma e Isa, en especial a Isa por siempre "sacar un hueco" para escuchar mis historias; y a Inma, por estar dispuesta a recorrer miles de kilómetros para poder compartir un rato con nosotras. A mis compañeros (y sin embargo amigos) de Juventudes, especialmente a Sara e Isra, por ser un claro ejemplo de que las ideas son

importantes, pero las personas que las tienen lo son mucho más. A mis amigos del instituto: a Isa (la China) por siempre estar cerca de mí aunque nos separe una gran distancia física; a Manolo y Chago, capaces de hacerme reír constantemente; y a Iván Clavero, que hace que, de año en año, cuando nos vemos, parezca que el tiempo no haya pasado y nuestras conversaciones puedan comenzar con la frase de Miguel de Unamuno, “decíamos ayer”. Sin embargo, Iván, cuando estoy contigo todo el tiempo del mundo no me parece suficiente. A mis amigos de piragüismo: Manu, Jorge, Héctor y Diego por enseñarme a remar a contracorriente, a sortear presas, chorros y a luchar contra “el monstruo del rabión”.

Gracias a toda mi familia. A los más importantes, mis padres y mi hermano, por ser el mejor ejemplo para saber que las cosas se consiguen con trabajo y esfuerzo, que ante las adversidades hay que levantarse, hacerse fuerte y seguir, que de todo hay que aprender y que cuando se toma una decisión, hay que asumir las consecuencias y llegar hasta el final y, sobre todo, gracias por apoyarme y quererme siempre. Miguel, yo quería dedicarte esta frase de José Saramago “la primera condición para vivir es no respetar a la autoridad” y, aunque ahora estés próximo a la autoridad, como son mis agradecimientos, te la dedico igualmente, pero con todos mis respetos, claro. Gracias a mis abuelas, para las que siempre he sido y seré “la más lista del mundo”. Gracias también a los que no están, mis abuelos, porque ellos también forman parte de lo que soy.

Gracias a ti, Roberto, porque sin entender que las leguminosas se estresen (y yo también), has estado a mi lado incondicionalmente. Por eso y por la vida que compartimos, esta Tesis es más tuya que mía. Gracias por enseñarme que es más fácil subir las cuestas de pie que sentada.

Y en mis agradecimientos no puedo olvidar determinados “elementos” clave: Rocky, el mejor perro del mundo, siempre dispuesto a dejarse acariciar con tal de hacerme feliz; Txula, que a pesar de sólo llevar unos meses con nosotros ya me ha enseñado que los grades instantes del día se forman con las pequeñas cosas del momento. Por supuesto, cómo olvidar a mi oso de peluche con el que tantas veces he cruzado la distancia que separa Zaragoza y Salamanca, siempre escuchando las canciones de Fito y Fitipaldis y en “manos” del pequeño gran Twingo rojo que nunca me ha fallado.

Y esta no sería mi Tesis si no mencionara a los bomberos. Gracias a todos los “cuerpos” de bomberos por alegrarnos los meses y por darnos “algo” de que hablar. Gracias especialmente a los bomberos de Gif-sur-Yvette, será difícil olvidar el 6 de Julio del 2009.

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ACC	Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico
AO	Ascorbato oxidasa
APX	Ascorbato peroxidasa
ATP	Adenosín tri-fosfato
CKs	Citokininas
DHA	Deshidroascorbato
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DR	Deshidroascorbato reductasa
DTE	Ditioeritritol
γ EC	γ -glutamilcisteína
γ ECS	γ -glutamilcisteína sintetasa
EDTA	Ácido etiléndiaminotetraacético
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
GA	Ácido giberélico
GLB	Hemoglobinas no simbióticas
GPX	Glutati3n peroxidasas
GR	Glutati3n reductasa
GSH	Glutati3n
GSHS	Glutati3n sintetasa
GSSG	Glutati3n oxidado
GUS	β -glucuronidasa
Hbs	Hemoglobinas
HEPES	<i>N</i> -(2-hidroxi3til)piperazina- <i>N'</i> -2-etanosulf3nico
hGSH	Homoglutati3n
hGSHS	Homoglutati3n sintetasa
IAA	Ácido indolac3tico
JA	Ácido jasm3nico
Lb	Leghemoglobina
MBB	Monobromobimano
MDHA	Monodeshidroascorbato
MR	Monodeshidroascorbato reductasa
NBT	Azul de nitrotetrazolio
PAs	Poliaminas
PF	Peso fresco
PRX	Peroxirredoxinas
PS	Peso seco
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
PVP	Polivinilpirrolidona
RNS	Especies reactivas de nitr3geno

ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNAP	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acetil-DL-penicilamina
SNP	Nitroprusiato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
Ψ_w	Potencial hídrico

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Leguminosas: características e importancia	1
1.2. Fijación biológica de nitrógeno	2
1.2.1. Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa	4
1.2.2. Regulación de la concentración de O ₂ en el nódulo	8
1.3. Hemoglobinas.....	9
1.3.1. Hemoglobinas simbióticas.....	9
1.3.2. Hemoglobinas no simbióticas.....	10
1.3.3. Hemoglobinas truncadas	12
1.4. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo	13
1.5. Especies reactivas de nitrógeno y estrés nitrosativo.....	17
1.6. Sistemas antioxidantes	19
1.6.1. Antioxidantes enzimáticos.....	19
1.6.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	21
1.7. Biosíntesis de glutatión y homoglutaión	22
1.8. Hemoglobinas y especies reactivas de nitrógeno	23
1.9. Estrés en plantas	24
1.9.1. Estrés salino.....	25
1.9.2. Otros estreses abióticos	27
1.10. Hormonas	28
2. OBJETIVOS	33

3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. Reactivos químicos y bioquímicos.....	37
3.2. Material biológico.....	37
3.2.1 Plantas.....	37
3.2.2. Microorganismos.....	40
3.3. Tratamientos.....	41
3.3.1. Tratamientos de estrés.....	41
3.3.2. Hormonas.....	42
3.3.3. Óxido nítrico.....	42
3.3.4. Inoculación con rizobios.....	42
3.4. Parámetros fisiológicos.....	43
3.5. Marcadores de daño oxidativo.....	44
3.6. Análisis de la expresión génica.....	45
3.6.1. Extracción de RNA.....	45
3.6.2. Síntesis de cDNA.....	46
3.6.3. Cuantificación de mRNA mediante qRT-PCR.....	46
3.7. Electroforesis y análisis <i>western blot</i>	48
3.7.1. Electroforesis.....	48
3.7.2. Transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno.....	48
3.7.3. Análisis <i>western blot</i>	49
3.8. Actividades enzimáticas.....	49
3.8.1. Superóxido dismutasa.....	50
3.8.2. Catalasa.....	51
3.8.3. Enzimas del ciclo ascorbato-glutación.....	51
3.8.4. Ascorbato oxidasa.....	53
3.9. Glutación y homoglutación sintetasas.....	53
3.10. Ascorbato reducido y oxidado.....	54
3.11. Glutación reducido y oxidado.....	55
3.12. Glutación y homoglutación total.....	55
3.13. Localización de transcritos en nódulos.....	56
3.13.1. Preparación del tejido.....	56
3.13.2. Preparación de las sondas.....	57
3.13.3. Hibridación <i>in situ</i>	59
3.13.4. Revelado y microscopía.....	61
3.14. Estudio de promotores de los genes <i>LjGLB</i>	62
3.14.1. Fusión promotor-gen informador.....	62
3.14.2. Transformación de plantas.....	63
3.14.3. Tinción β -glucuronidasa.....	64
3.14. Análisis estadístico.....	64
4. RESULTADOS	67
4.1. Antioxidantes de <i>Lotus japonicus</i> en condiciones de estrés salino.....	67
4.1.1. Estado fisiológico de la planta y daño oxidativo.....	67

4.1.2. Expresión de enzimas antioxidantes.....	69
4.1.3. Ascorbato y glutatión	74
4.2. Tiol sintetetasas de <i>Lotus japonicus</i>	74
4.2.1. Regulación de las tiol sintetetasas en respuesta a óxido nítrico y hormonas	74
4.2.2. Efecto de las hormonas sobre el contenido y síntesis de tioles en raíces	76
4.3. Hemoglobinas no simbióticas y truncadas de <i>Lotus japonicus</i>	77
4.3.1. Estructura de los genes <i>LjGLB</i>	77
4.3.2. Expresión de los genes <i>LjGLB</i> en la planta	80
4.3.3. Localización de los transcritos y actividades de los promotores <i>LjGLB</i> en nódulos	81
4.3.4. Expresión de los genes <i>LjGLB</i> en respuesta a óxido nítrico y estrés abiótico.....	84
4.3.5. Expresión de los genes <i>LjGLB</i> en respuesta a hormonas	86
4.3.6. Expresión de los genes <i>LjGLB</i> en respuesta a microsimbiontes.....	88
5. DISCUSIÓN	93
5.1. Respuesta antioxidante de <i>Lotus japonicus</i> al estrés salino	93
5.1.1. Estado fisiológico de la planta y daño oxidativo	93
5.1.2. Expresión de enzimas antioxidantes.....	94
5.2. Regulación de las tiol sintetetasas de <i>Lotus japonicus</i> en respuesta a óxido nítrico y hormonas.....	96
5.3. Hemoglobinas no simbióticas y truncadas de <i>Lotus japonicus</i>	98
5.3.1. Estructura de los genes <i>LjGLB</i> y análisis filogenético de las proteínas.....	98
5.3.2. Expresión diferencial de los genes <i>LjGLB</i> en órganos vegetales	100
5.3.3. Localización de los transcritos de los genes <i>LjGLB</i> en nódulos.....	100
5.3.4. Regulación de la expresión de los genes <i>LjGLB</i> en respuesta a óxido nítrico, estrés abiótico y hormonas.....	101
5.3.5. Regulación de la expresión de los genes <i>LjGLB</i> en la interacción con microsimbiontes	104
6. CONCLUSIONES	109
7. BIBLIOGRAFÍA	113

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leguminosas: características e importancia

La familia Leguminosae comprende *c.* 700 géneros y 18000 especies de plantas herbáceas, arbustivas o arbóreas. Se divide en tres subfamilias: Caesalpinioideae (más primitivas), Mimosoideae y Papilionoideae (más avanzadas evolutivamente). Son plantas cosmopolitas, siendo su distribución más frecuente en climas tropicales y subtropicales. Después de los cereales, constituyen el segundo grupo de plantas cultivadas más importante, abarcando un 12% de las tierras agrícolas en el mundo (Sánchez y cols, 2008). Su importancia se debe a que son una fuente esencial de alimentación humana y animal. Aportan proteínas (especialmente ricas en lisina), minerales (Ca, Fe, Cu, Zn, P, S, Mg) y vitaminas hidrosolubles (tiamina, riboflavina, niacina); además, poseen abundantes compuestos secundarios, algunos de gran importancia para la salud, como las isoflavonas. También son utilizadas en la industria para la obtención de aceites minerales y materias primas. Entre las leguminosas de mayor importancia agrícola podemos destacar leguminosas de grano como la judía (*Phaseolus vulgaris*), soja (*Glycine max*), guisante (*Pisum sativum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), haba (*Vicia faba*) y lenteja (*Lens culinaris*), y leguminosas forrajeras como la alfalfa (*Medicago sativa*), meliloto blanco (*Melilotus albus*), trébol rojo (*Trifolium pratense*) y distintas especies del género *Lotus* (*L. corniculatus*, *L. tenuis*). A nivel medioambiental, las leguminosas juegan un papel fundamental al fijar nitrógeno atmosférico (N₂) tras establecer simbiosis con unas bacterias del suelo denominadas rizobios (apartado 1.2.).

En condiciones naturales la productividad de las leguminosas se encuentra limitada por diversos factores abióticos y bióticos, por lo que es necesario estudiar diferentes aspectos de su biología, en especial la fijación de N_2 , así como desarrollar plantas tolerantes a diversos tipos de estrés, especialmente hídrico y salino. Puesto que la planta modelo *Arabidopsis thaliana* no es capaz de establecer simbiosis con los rizobios, se han propuesto dos leguminosas, *Medicago truncatula* (Baker, 1990) y *Lotus japonicus* (Handberg y Stougaard, 1992), como modelos para el análisis genético y molecular de la simbiosis ya que presentan diversas ventajas con respecto a las leguminosas de interés agronómico: poseen un pequeño genoma diploide, son autógamas, tienen un ciclo de generación corto y una elevada producción de semillas, y son fáciles de transformar. Además, los genomas nucleares de estas especies se encuentran en una fase avanzada de secuenciación, y los genomas de los correspondientes rizobios, *Sinorhizobium meliloti* y *Mesorhizobium loti*, están totalmente secuenciados.

1.2. Fijación biológica de nitrógeno

El N es el cuarto elemento más abundante en las plantas después del C, H y O. Es un constituyente fundamental en los tejidos vegetales ya que forma parte de biomoléculas esenciales como aminoácidos, nucleótidos, proteínas, ácidos nucleicos, porfirinas y alcaloides. En la atmósfera, el N constituye el 78% del total de los gases que la componen y se encuentra en forma de dinitrógeno (N_2), molécula totalmente inerte. En la litosfera, el N representa menos del 0,1%, localizándose mayoritariamente en las rocas. Sin embargo, solamente el 0,03% del N de la litosfera integra parte del suelo y, de éste, un 1-2% se encuentra en forma asimilable por las plantas, como nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+). Por tanto, a pesar de que el N es el elemento más abundante en la atmósfera, es un factor limitante para el desarrollo vegetal. La incorporación de este elemento a los sistemas biológicos se realiza mediante procesos de reducción del N_2 a NH_4^+ . Se estima que *c.* 10 millones de Tm de N se fijan cada año por oxidación del N_2 en presencia de O_2 y vapor de agua durante las descargas eléctricas producidas en las tormentas; además, entre 90-140 millones de Tm de N son fijados por microorganismos en los ecosistemas terrestres mediante la fijación biológica de nitrógeno (FBN).

La FBN es catalizada por el complejo nitrogenasa, el cual es sensible al O_2 y exclusivo de procariotas de vida libre o en simbiosis con plantas. Los organismos del

primer grupo se engloban dentro de las arqueobacterias y eubacterias que pueden ser quimiolitotrofas o fotótrofas, anaerobias estrictas (*Clostridium*), facultativas (*Klebsiella*, *Citrobacter*), microaerobias (*Azospirillum*, *Xanthobacter*) o aerobias (*Azotobacter*). La FBN por asociación simbiótica entre plantas y microorganismos diazotrofos puede ser de distintos tipos: cianobacterias de los géneros *Nostoc* y *Anabaena* asociadas con helechos del género *Azolla*, gimnospermas del orden Cycadales y angiospermas del género *Gunnera*; interacción de algunas angiospermas no leguminosas con bacterias del género *Frankia* para formar simbiosis actinorrícicas; simbiosis de las leguminosas con bacterias de la familia Rhizobiaceae; y endofitos diazotrofos, que son bacterias que viven en el suelo y sólo fijan N₂ cuando están asociadas a las raíces de gramíneas y otras especies de plantas no leguminosas.

Otra fuente de entrada de N en los sistemas biológicos es la fertilización con abonos nitrogenados, fabricados a nivel industrial mediante la reducción de N₂ con H₂ para formar NH₄⁺, proceso que tiene lugar a temperaturas próximas a 500°C y 300 atm de presión (reacción de Haber-Bosch). La fertilización química conlleva un elevado coste energético y económico, además de ser un potencial riesgo de contaminación ambiental. Esto puede ser debido a dos factores: la acumulación de NO₃⁻ en aguas subterráneas y superficiales, que provoca la eutrofización; y la liberación de gases nitrogenados a la atmósfera, como los óxidos de nitrógeno (NO_x) que favorecen la lluvia ácida, el óxido nitroso (N₂O) que contribuye al efecto invernadero y a la destrucción de la capa de ozono, y el amoníaco (NH₃) que tiene efectos nocivos sobre la salud animal y favorece, junto con la lixiviación del NO₃⁻, la acidificación del suelo. Otro aspecto a tener en cuenta es que la fertilización de zonas que previamente eran deficitarias en N puede alterar la biodiversidad de los ecosistemas.

En el caso de los suelos cultivados, la cantidad de N disponible es muy baja y limita la producción agrícola disminuyendo el área foliar, la tasa fotosintética y el crecimiento vegetativo de los tejidos. Sin embargo, el uso de fertilizantes nitrogenados no resuelve las carencias de N de los suelos y su aplicación incontrolada puede tener efectos negativos en el medio ambiente. Por tanto, la FBN se presenta como una alternativa a la fertilización química, pues favorece el desarrollo de una agricultura sostenible. En este sentido, la FBN llevada a cabo por la simbiosis rizobio-leguminosa es la más importante. Se estima que la tasa anual de FBN por las leguminosas se encuentra entre 40 y 60 millones de Tm.

Esto supone un gran ahorro en el uso de fertilizantes químicos y permite a las leguminosas desarrollarse en suelos pobres en nutrientes (Aparicio-Tejo y cols, 2000).

1.2.1. Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa

Rizobios

La familia Rhizobiaceae está formada por al menos ocho géneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium* y *Mesorhizobium*) pertenecientes a las Proteobacterias de los subgrupos α y β . Son bacterias gram negativas, móviles, que no esporulan. Cinco géneros de esta familia son capaces de interactuar con leguminosas: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Azorhizobium*, *Allorhizobium* y *Mesorhizobium* (**Tabla 1**).

Rhizobium es una bacteria de crecimiento rápido que nodula a leguminosas de climas templados. Los genes bacterianos para la nodulación se encuentran en el plásmido simbiótico (sym). *Bradyrhizobium* es de crecimiento lento (5-7 d) y nodula a leguminosas de climas tropicales y subtropicales. *Mesorhizobium* tiene una velocidad de crecimiento intermedia entre *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Los genes de nodulación para los géneros *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* se localizan en el cromosoma bacteriano. *Sinorhizobium* es de crecimiento rápido y presenta una homología del 96% con la secuencia ARN ribosomal 16S de *Rhizobium*. *Azorhizobium* es capaz de desarrollar nódulos fotosintéticos en la leguminosa de origen tropical *Sesbania rostrata* y de fijar N₂ no simbióticamente en concentraciones de O₂ inferiores al 3%, (Aparicio-Tejo y cols, 2000; Ramos y Bisseling, 2004). *Allorhizobium* está más próximo filogenéticamente al género *Agrobacterium* y es capaz de formar nódulos en el tallo de la leguminosa acuática de origen tropical *Neptunia natans* (de Lajudie y cols, 1998).

Tabla 1. Algunas bacterias de la familia Rhizobiaceae que forman nódulos con leguminosas.

Género	Especie	Planta hospedadora
<i>Allorhizobium</i>	<i>undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>loti</i>	<i>Lotus japonicus</i>
	<i>ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>plurifarium</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
	<i>leguminosarum</i>	<i>Medicago</i> sp.
<i>Rhizobium</i>		<i>Phaseolus</i> sp.
		<i>Pisum</i> sp.
	<i>tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>
	<i>medicae</i>	<i>Medicago</i> sp.
	<i>terangae</i>	<i>Acacia taeta</i>

Interacción rizobio-leguminosa

La simbiosis rizobio-leguminosa requiere el establecimiento de un diálogo molecular entre ambos componentes que finaliza con la formación de un nuevo órgano llamado nódulo, donde tiene lugar la FBN. La planta libera flavonoides que inducen el crecimiento de la flora rizobiana del suelo, la quimiotaxis de los rizobios hacia la superficie de la raíz y la expresión de los genes responsables de la nodulación en la bacteria (genes *nod*). Estos genes participan en la síntesis de los quitinolisacáridos que constituyen la estructura central de los factores de nodulación (factores Nod) responsables del inicio de la nodulación.

Los factores Nod son lipoquitinolisacáridos, constituidos por 3-5 residuos de *N*-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces $\beta(1-4)$ y por una cadena acil lipídica de 16 a 26 átomos de C con distinto grado de insaturación. Aunque se han descrito similitudes entre los mecanismos de la simbiosis y la patogénesis (Soto y cols, 2006), existe una especificidad genética por la cual la interacción simbiótica se establece sólo cuando la planta dispone del receptor adecuado para reconocer el correspondiente factor Nod sintetizado por la bacteria. Esta especificidad está determinada por los grupos acetato o sulfato añadidos al oligosacárido y por el grado de insaturación del ácido graso.

Formación y tipos de nódulos

Los factores Nod inician el proceso de nodulación provocando, en primer lugar, una despolarización de la membrana con entrada de calcio al citoplasma, que favorece la deformación del pelo radical. A continuación, las bacterias se adhieren a la raíz gracias a glicoproteínas (lectinas) producidas por la planta y polisacáridos (lipopolisacáridos y exopolisacáridos) de la superficie bacteriana (Ramos y Bisseling, 2004). Los rizobios entran en las células de los pelos radicales al secretar celulasas que degradan parcialmente la pared celular. Mediante la invaginación de la membrana plasmática, las bacterias quedan dentro de una estructura tubular de origen vegetal llamada cordón de infección. En este momento, se da también la expresión de genes de la planta que codifican para las nodulinas. En la corteza radical, tiene lugar la elongación del cordón de infección hasta alcanzar la base del pelo radical y la formación del primordio nodular que posee un meristemo con capacidad mitótica activa. Por endocitosis, las bacterias se liberan al citoplasma vegetal transformándose en bacteroides, en cuyo interior se produce la fijación de N_2 , envueltas en una membrana procedente del plasmalema vegetal. Los bacteroides junto con la envoltura vegetal, denominada membrana peribacteroidal, constituyen el simbiosoma.

Existen dos tipos de nódulos, determinados e indeterminados, que difieren en su morfología y algunas características bioquímicas (**Fig. 1**). Ambos tipos de nódulos poseen una zona central con células infectadas o no, rodeadas por el córtex, endodermis, parénquima nodular y tejido vascular. Los nódulos determinados se forman a partir de primordios establecidos en el córtex externo. Son esféricos, contienen simbiosomas con un número variable de bacteroides y aparecen frecuentemente en las leguminosas de climas tropicales y subtropicales. Los nódulos indeterminados se originan a partir de primordios del córtex interno, son alargados y cilíndricos, cada simbiosoma está ocupado por un solo bacteroide y son característicos de leguminosas de climas templados. Los nódulos indeterminados poseen un meristemo persistente que favorece una diferenciación acropétala en la que se diferencian varias zonas: zona I o meristemo apical; zona II, constituida a su vez por dos subzonas, la de invasión y la de preinfección; zona III o zona fijadora de N_2 en la que generalmente hay mezcla de células infectadas y no infectadas; y zona IV o zona senescente.

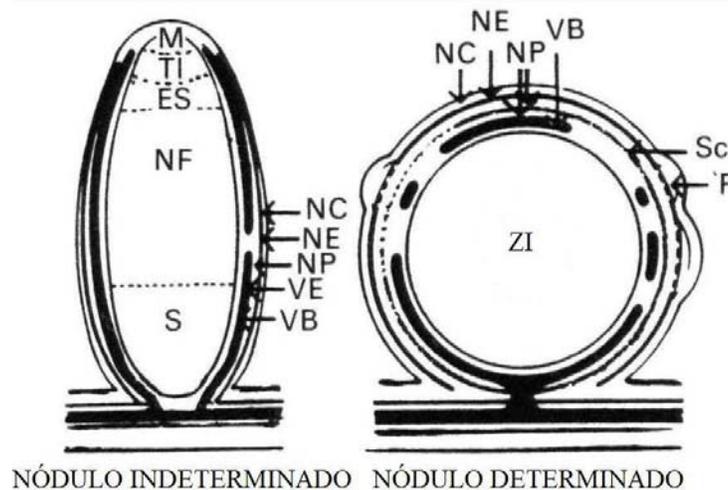
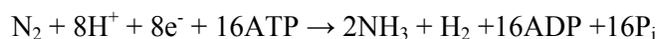


Figura 1. Esquema de las estructuras de los nódulos indeterminados y determinados (modificado de Hirsch, 1992). NC, córtex; NE, endodermis; NP, parénquima; VE, endodermis vascular; VB, tejido vascular; Sc, esclerénquima; P, peridermis; S, zona de infección. Nódulo indeterminado: S, zona senescente; NF, zona fijadora de N_2 ; ES, zona de simbiosis temprana; TI, zona de invasión; M, meristemo. Nódulo determinado: ZI, zona infectada que incluye la zona fijadora de N_2 .

El N_2 fijado por ambos tipos de nódulos es excretado al citosol en forma de NH_4^+ y asimilado por las enzimas glutamina sintetasa/glutamato sintasa. En el caso de las leguminosas con nódulos determinados, el N_2 fijado es exportado generalmente en forma de ureidos (alantoína y ácido alantoico), mientras que las de nódulos indeterminados lo exportan en forma de amidas (asparagina y glutamina). En el caso de las leguminosas modelo, *L. japonicus* forma nódulos determinados, si bien constituye una excepción pues produce mayoritariamente amidas, mientras que *M. truncatula* produce nódulos indeterminados y también exporta el N_2 fijado en forma de amidas.

Complejo nitrogenasa

La nitrogenasa es el complejo enzimático clave para la fijación de nitrógeno, reduciendo el N_2 a NH_4^+ y el H^+ a H_2 según la reacción:



El complejo está formado por dos metaloproteínas: una ferroproteína (Fe-proteína) o dinitrogenasa reductasa y una ferromolibdoproteína (FeMo-proteína) o dinitrogenasa. La Fe-proteína es un homodímero (α_2), codificado por el gen *nifH*, que contiene cuatro átomos de Fe y un centro 3Fe-4S. La FeMo-proteína es un tetrámero ($\alpha_2\beta_2$) codificado por el gen *nifDK* con dos tipos de centros: centro P (4Fe-4S) y cofactor FeMoco, que

representa el sitio activo de la enzima donde se reduce el sustrato. La Fe-proteína se activa con dos moléculas de MgATP y recibe los electrones procedentes de la ferredoxina. A continuación, se forma el complejo nitrogenasa por unión de las dos metaloproteínas a través de la interacción de la Cys y la His de la Fe-proteína con el Fe y el Mo de la FeMo-proteína, respectivamente, el ATP se hidroliza y mediante la transferencia de un electrón, se reduce la Fe-proteína. Finalmente, la FeMo-proteína intercambia MgADP por MgATP y se inicia nuevamente el ciclo. Se necesitan ocho electrones para reducir una molécula de N_2 , seis para la reducción del N_2 y dos para la liberación del H_2 . Una vez acumulados los electrones necesarios, el sustrato es reducido por la FeMo-proteína.

1.2.2. Regulación de la concentración de O_2 en el nódulo

El O_2 inactiva de manera irreversible al complejo nitrogenasa. No obstante, el proceso de FBN consume gran cantidad de ATP producido por la respiración bacteroidal. Por ello, la concentración de O_2 en el nódulo debe estar estrictamente regulada; para ello existen dos mecanismos fundamentales: la barrera a la difusión de O_2 y la leghemoglobina (Lb). La barrera a la difusión de O_2 está localizada en el córtex interno y restringe el paso del gas hacia la zona de infección. Se desconoce el mecanismo celular y molecular mediante el cual actúa, pero se piensa que las variaciones en la resistencia se deben a cambios en el contenido de agua de los espacios intercelulares, lo que limita la difusión del O_2 debido a su baja solubilidad. Las fluctuaciones en el contenido de agua pueden deberse a la secreción de glicoproteínas o a cambios en la concentración de solutos osmóticamente activos, como la sacarosa. El O_2 difunde hasta la zona central del nódulo y desde allí es transportado hasta la membrana del simbiosoma unido a la Lb. En la membrana del simbiosoma, el O_2 es liberado y difunde por el espacio peribacteroidal hasta alcanzar las oxidasas terminales del bacteroide, que tienen una elevada afinidad por el O_2 y favorecen que los niveles en torno al complejo nitrogenasa estén entre 20-100 nM. Las Lbs y otras hemoglobinas (Hbs) presentes en los nódulos y otros órganos vegetales se describirán a continuación.

1.3. Hemoglobinas

Las Hbs son proteínas globulares constituidas por seis a diez α -hélices dispuestas en torno a un grupo prostético hemo, que consiste en una protoporfirina IX con un átomo de hierro, coordinado a los cuatro nitrógenos pirrólicos centrales y al que se une el ligando, generalmente un gas diatómico como el O₂, óxido nítrico (NO) o monóxido de carbono (CO) (Herold y Puppo, 2005). El sistema pirrólico es hidrofóbico y sus electrones están totalmente deslocalizados. El grupo hemo se une a la cadena polipeptídica globular mediante un enlace covalente a través de la His proximal. Cerca del lugar de unión al ligando, las Hbs contienen, además, una His distal que interviene en la regulación de la unión con el sustrato.

Las Hbs están ampliamente distribuidas en la naturaleza y sus funciones se relacionan con el almacenamiento, transporte, difusión o destoxificación de O₂, CO y NO, y en algunos casos con la transferencia de electrones (Arredondo-Peter y cols, 1998). En plantas, las Hbs constituyen una familia multigénica codificada por genes con cuatro exones y tres intrones. El primer y el tercer intrón se encuentran en posiciones homólogas a las de los dos intrones de la α y β globina de los vertebrados y la mioglobina (Andersson y cols, 1996). Se han descrito tres tipos de Hbs: simbióticas, no simbióticas y truncadas (Hoy y Hargrove, 2008).

1.3.1. Hemoglobinas simbióticas

En 1939, Kubo identificó en nódulos de soja una proteína, la Lb, con características similares a la mioglobina de mamíferos. Los genes que codifican las Lbs se expresan únicamente en las células infectadas de los nódulos, una vez establecida la simbiosis con los rizobios del suelo. Inicialmente, se pensó que las Hbs simbióticas eran exclusivas de leguminosas, pero posteriormente se detectaron Hbs que transportan O₂ durante la FBN en otras especies de plantas (*Parasponia andersonii*, *Casuarina glauca*, *Alnus firma*) capaces de formar simbiosis (Landsmann y cols, 1986; Pathirana y Tjepkema, 1995; Suharjo y Tjepkema, 1995). Sin embargo, estas Hbs no son exclusivas de los nódulos, expresándose en otros tejidos de la planta (Bogusz y cols, 1988).

Los promotores de los genes *Lb* contienen motivos conservados, denominados “cajas de nodulación”, que corresponden a las secuencias AAAGAT y CTCTT, separadas entre sí por seis nucleótidos. Estos motivos no están presentes en las Hbs simbióticas de no

leguminosas (**Fig. 2**), ni en las Hbs no simbióticas de plantas, por lo que parecen ser la clave para la localización específica de estas proteínas en nódulos de leguminosas (Ramlov y cols, 1993; Szczyglowski y cols, 1994).

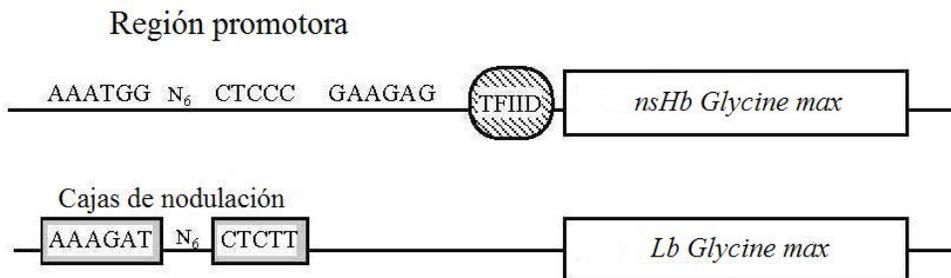


Figura 2. Diferencias en la secuencia reguladora de la región promotora de las Lbs y Hbs no simbióticas. Cajas de nodulación de las Lbs (modificado de Hardison, 1998).

Las Lbs facilitan el transporte de O₂ hasta la membrana simbiosomal, evitando la inactivación irreversible de la nitrogenasa. Esta función es posible gracias a la rápida asociación de la hemoproteína con el O₂ y a la lenta disociación del mismo (Appleby y cols, 1988). Su papel durante la FBN se ha comprobado en plantas de *L. japonicus* mediante el silenciamiento de los genes que codifican para las tres Lbs de esta especie mediante la técnica de RNA de interferencia. En estos estudios, las plantas mostraban un aumento en la concentración de O₂ libre en la célula, descenso en la proporción ATP/ADP y pérdida de la actividad nitrogenasa; no obstante, cuando se les suministró N en la solución nutritiva, las plantas crecieron igual que las plantas control (Ott y cols, 2005).

1.3.2. Hemoglobinas no simbióticas

A diferencia de las Lbs, cuya expresión es abundante y exclusiva de nódulos, las Hbs no simbióticas se expresan en los distintos tejidos de la planta, incluidos los nódulos, aunque a una concentración mucho menor que la Lb (Anderson y cols, 1996). En contra de la tradicional pentacoordinación de las Lbs, las Hb no simbióticas son hexacoordinadas, con la His distal unida al átomo de hierro tanto en su estado oxidado como reducido (**Fig. 3**), generando una estructura con propiedades espectrales similares a las del citocromo *b5* (Hargrove y cols, 2000). Esta hexacoordinación es reversible, de modo que los ligandos (O₂, NO y CO) pueden unirse rápidamente con elevada afinidad (Kundu y cols, 2003). Esta estructura hexacoordinada de las Hbs no simbióticas está ampliamente distribuida en

la naturaleza, habiéndose identificado en Hbs truncadas de microorganismos fotosintéticos, *Synechocystis* y *Chlamydomonas* (Falzone y cols, 2002; Couture y cols, 1999), neuroglobina y citoglobina de humanos y animales (Burmester y cols, 2000) y Hbs de *Drosophila* (Hankeln y cols, 2002). Esta estructura les confiere una elevada estabilidad en la unión con el O₂ en comparación con la coordinación reversible que presenta la Lb, de modo que, aparentemente, las Hbs no simbióticas no son buenos transportadores de O₂ (Trevaskis y cols, 1997).

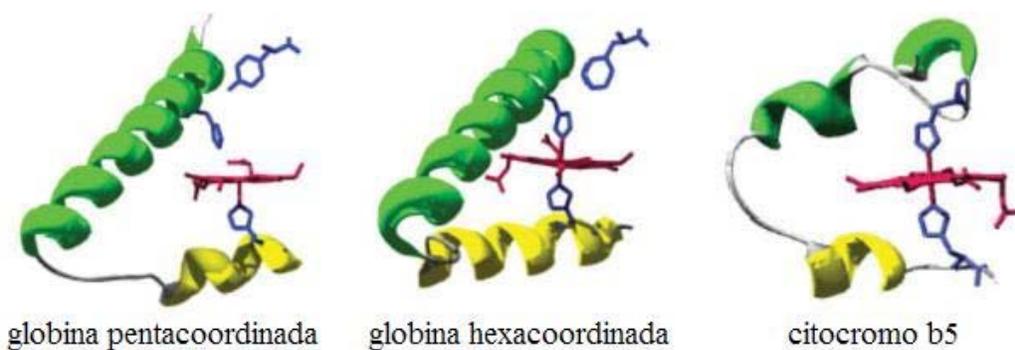


Figura 3. Coordinación del grupo hemo: pentacoordinación de la Lb de soja y hexacoordinación de la Hb de arroz (*Oryza sativa*) y del citocromo *b5* de microsomas de hígado de buey (modificado de Smagghe y cols, 2009).

Atendiendo a las relaciones filogenéticas, el patrón de expresión y las características de unión con el O₂, las Hbs no simbióticas se pueden dividir en clase 1 (GLB1) y clase 2 (GLB2). Las GLB1 tienen una mayor afinidad por el O₂ que las GLB2 (**Tabla 2**) puesto que la coordinación del grupo hemo con la His distal es más fuerte (Bruno y cols, 2007). Evolutivamente, las Hbs no simbióticas han dado origen a las simbióticas. Las Lbs y la Hb simbiótica de *Casuarina glauca* presentan una mayor homología con las GLB2 (Appleby, 1992), mientras que la Hb simbiótica de *Parasponia* habría derivado de la GLB1 (Appleby y cols, 1983).

Tabla 2. Afinidad de las Hbs de cebada (*Hordeum vulgare*), arroz y *A. thaliana* por el O₂ (Dordas, 2009). K_{on} , constante de asociación; K_{off} , constante de disociación; $K(O_2)$, constante de afinidad.

Proteína	K_{on} (mM ⁻¹ s ⁻¹)	K_{off} (s ⁻¹)	$K(O_2) = K_{on}/K_{off}$ (μM ⁻¹)
Lb de soja	120	5,6	21
Hb de <i>Parasponia</i>	165	15	11
GLB1 de cebada	7,1	0,027	263
GLB1 de arroz	68	0,038	1790
GLB1 de <i>A. thaliana</i>	0,192	0,12	1,6
GLB2 de <i>A. thaliana</i>	18,2	0,14	130

Se ha sugerido que las GLB1 están implicadas en la respuesta a hipoxia, manteniendo los estados redox y energético de las células vegetales. En hipoxia, las concentraciones de NADH y NO en la célula aumentan, las GLB1 captarían el O₂ y oxidarían el NO a NO₃⁻, de modo que el grupo hemo pasaría de estado ferroso a férrico para ser nuevamente reducido por el NADH con la concomitante formación de NAD⁺ (Iganberdiev y cols, 2004). Los genes *GLB1* se inducen por estrés osmótico y salino, en respuesta a ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en deficiencias de P, K y Fe, y en la interacción con simbiontes (Jokipii-Lukkari y cols, 2009). La expresión del gen *GLB2* de *A. thaliana* se induce en respuesta a las citokininas (CKs; Hunt y cols, 2001) y bajas temperaturas (Trevaskis y cols, 2007).

En *A. thaliana*, el silenciamiento del gen *GLB1* en mutantes deficientes en la GLB2 provocó la muerte de las semillas jóvenes, mientras que si en estos mutantes no se silenciaba *GLB1* se formaban semillas viables. Estos estudios demuestran la importancia de las Hbs no simbióticas durante el desarrollo, siendo necesario que al menos uno de estos genes sea funcional (Hebelstrup y cols, 2006).

1.3.3. Hemoglobinas truncadas

Las Hbs truncadas (GLB3) presentan una estructura “2-on-2”, al contrario que el resto de las Hbs, que poseen una estructura típica “3-on-3” consistente en tres α-hélices plegadas sobre cada uno de los lados del grupo hemo (**Fig. 4**). Las GLB3 poseen una His proximal, mientras que la His distal puede ser sustituida por otro aminoácido (Wittenberg y cols, 2002). En plantas, este tipo de Hb fue descrito por primera vez en plantas en el alga verde unicelular *Chlamydomonas eugametos* y contiene una Gln reemplazando a la His distal (Couture y cols, 1994). En *A. thaliana*, se ha identificado un gen *GLB3* que se expresa en raíces y en la parte aérea de la planta. Esta proteína es pentacoordinada pero, en su estado

desoxigenado, adquiere una conformación transitoria hexacoordinada (Hoy y Hargrove, 2008).

Aunque las funciones de estas Hbs están poco definidas, en *M. truncatula* se han estudiado dos genes *GLB3*. Su función parece estar relacionada con la simbiosis, suprimiendo la respuesta defensiva inicial de la planta al unirse con el NO (Vieweg y cols, 2005). Este mismo papel se ha propuesto para la *GLB3* de *Dastica glomerata* en su interacción con *Frankia* (Pawlowski y cols, 2007). Además, el gen *GLB3* de *A. thaliana* disminuye su expresión en respuesta a hipoxia, lo que sugiere que la función de la proteína no está relacionada con el transporte de O_2 (Watts y cols, 2001). Las *GLB3* se han identificado en organismos patógenos, fotosintéticos o fijadores de N_2 , y se ha propuesto que están involucradas en el almacenamiento de sustratos, la destoxificación del NO, la detección de los niveles de O_2 y NO, diversas reacciones redox o en la respuesta a hipoxia (Nardini y cols, 2007).

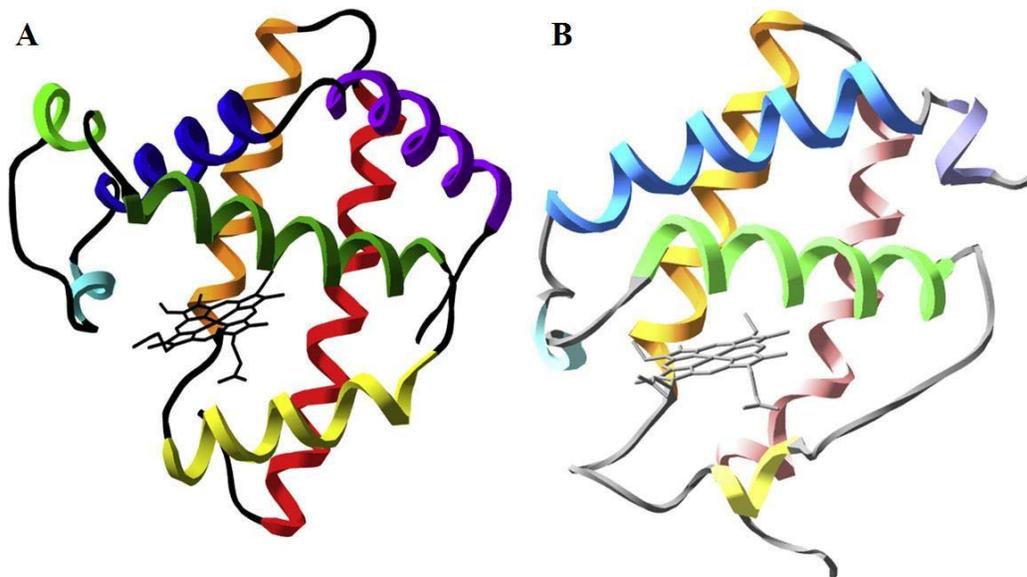


Figura 4. (A) Estructura “3-on-3” y (B) estructura “2-on-2” de las Hbs (Hoy y Hargrove, 2008).

1.4. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

El O_2 es una molécula relativamente estable. No obstante, los procesos de transferencia de energía o electrones para su reducción durante las reacciones metabólicas generan especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS incluyen radicales libres [radical

superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y radical hidroxilo ($\cdot OH$) y no radicales libres [H_2O_2 y oxígeno singlete (1O_2)]. En una primera reacción, el O_2 forma $O_2^{\cdot-}$ o la especie protonada del mismo, el hidropéroxido ($HO_2^{\cdot-}$), ambos con un tiempo de vida corto (2-4 μs). El $O_2^{\cdot-}$ puede inactivar distintas enzimas que contienen átomos de Fe o S, mientras que, el $HO_2^{\cdot-}$ se forma a pH ácido y está implicado en la oxidación de lípidos al captar protones de los ácidos grasos poliinsaturados (Van Breusegem y cols, 2001). En una siguiente reacción, se origina H_2O_2 que es relativamente estable. El H_2O_2 difunde fácilmente desde el lugar donde se forma dentro de la célula hasta otros compartimentos celulares, incluso a células adyacentes, y puede inactivar enzimas mediante la oxidación de grupos tiol (Halliwell, 2006). El $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 en presencia de algunos metales, como Fe y Cu, dan lugar, mediante la reacción de Haber-Weiss, al radical $\cdot OH$, que presenta una reactividad química elevada (Kehrer, 2000). El 1O_2 se forma a partir del O_2 en triple estado (3O_2) y puede transferir su energía dañando membranas e induciendo la muerte celular (Ryter y Turrell, 1998).

Tradicionalmente, las ROS han sido consideradas moléculas tóxicas debido a su capacidad para oxidar componentes celulares provocando la muerte de la célula. Sin embargo, las ROS, a concentraciones estrictamente controladas por los sistemas antioxidantes (apartado 1.6.), tienen una función muy importante como moléculas señal, interviniendo en procesos importantes como el desarrollo y expansión celular, el cierre estomático, la senescencia y muerte celular, la germinación y dormancia de semillas o la adaptación al estrés (Mittler y cols, 2004; Foyer y Noctor, 2005). Las ROS pueden intervenir en la señalización a tres niveles: siendo detectadas por sensores y activando una cascada de señalización que conduce a la modificación de la expresión génica; activando o inactivando algún componente de la cascada de señalización por un proceso de oxidación; y, actuando directamente sobre factores de transcripción y por consiguiente modulando la expresión génica (Apel y Hirt, 2004; Mittler y cols, 2004; Scandalios, 2005). En las plantas, los principales procesos metabólicos donde se generan ROS son la respiración, la fotosíntesis y el metabolismo peroxisomal. Además, en el caso de las leguminosas, se producen ROS durante la fijación de N_2 en el nódulo.

Producción de ROS en mitocondrias. La respiración aeróbica tiene lugar en las mitocondrias de todos los organismos aerobios y es energéticamente más ventajosa que los procesos de fermentación y respiración anaeróbica. Durante este proceso se lleva a

cabo la reducción completa del O_2 a una molécula de H_2O mediante la transferencia de cuatro electrones. Sin embargo, esta reducción se produce de manera secuencial, lo que provoca la formación de ROS. De hecho, se estima que *c.* 1-2% del O_2 consumido durante la respiración es reducido a ROS. Los principales sitios de producción de ROS en la membrana interna mitocondrial son los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa). El radical $O_2^{\cdot-}$ producido en estos complejos es dismutado posteriormente a H_2O_2 por la manganeso-superóxido dismutasa (MnSOD) de la matriz mitocondrial.

Producción de ROS en cloroplastos. Los cloroplastos son el principal sitio de producción de ROS en plantas. Durante la fotosíntesis se pueden generar ROS tanto en el fotosistema I como II. En el fotosistema I se produce la fotorreducción del O_2 (reacción de Mehler) a radical $O_2^{\cdot-}$. En el fotosistema II, el estado excitado de la clorofila (P_{680}) puede transferir al O_2 su energía de excitación formando 1O_2 (Apel y Hirt, 2004; Halliwell y Gutteridge, 2007).

Producción de ROS en peroxisomas. Los peroxisomas son el principal sitio de producción de H_2O_2 en la célula. Esta ROS se produce durante la fotorrespiración, la β -oxidación de los ácidos grasos, la oxidación del ácido úrico por la urato oxidasa y la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ por la acción de las SODs peroxisomales. Además de H_2O_2 , en los peroxisomas se produce $O_2^{\cdot-}$ por la acción de la xantina oxidasa en la matriz y por una cadena de transporte de electrones dependiente de NAD(P)H localizada en la membrana peroxisomal (Del Río y cols, 2006). En respuesta a algunos estreses, se ha observado un aumento en el número de peroxisomas de la célula. Esto, junto con la capacidad de este orgánulo para producir y regular la liberación de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS), determina que los peroxisomas tengan un papel clave en la respuesta al estrés oxidativo en plantas (Corpas y cols, 2001).

Producción de ROS en los nódulos. Los nódulos tienen un elevado potencial para formar ROS. La elevada tasa respiratoria de mitocondrias y bacteroides, así como la oxidación de la nitrogenasa, hidrogenasa y ferredoxina, producen $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . Además, la Lb se autooxida fácilmente en las condiciones de pH ligeramente ácido de los nódulos, liberando $O_2^{\cdot-}$.

Las ROS no sólo se producen durante el metabolismo normal de la célula, sino que sus niveles pueden aumentar durante condiciones de estrés. En condiciones fisiológicas, la producción y eliminación de ROS está equilibrada debido a los mecanismos antioxidantes de las células. Sin embargo, en condiciones de estrés se rompe este balance, lo que puede originar la pérdida de la eficiencia metabólica y funcional de la célula, provocando una situación conocida como estrés oxidativo (Scandalios, 2005). Éste se caracteriza por la acumulación de productos de la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Un estrés oxidativo intenso puede incluso llegar a ocasionar la muerte celular.

Daño oxidativo a lípidos. La peroxidación de lípidos es una reacción en cadena que puede iniciarse por el radical $\cdot\text{OH}$ o el $^1\text{O}_2$ (Bhattacharjee, 2005), o por la acción de las lipooxigenasas en células vegetales. La peroxidación de lípidos se inicia cuando un grupo metileno de un ácido graso poliinsaturado pierde un átomo de H, formando hidroxiperóxidos de lípidos que se descomponen para dar lugar a otras especies reactivas, como los radicales alcoxilos, alcanos, éoxidos de lípidos y aldehídos citotóxicos como el malondialdehído (Sevanian y Hochstein, 1985; Halliwell, 2006). La peroxidación de lípidos ocasiona daños a las membranas celulares alterando su estructura y función por fenómenos de descompartimentación iónica, pérdida del potencial de membrana, inhibición del transporte y modificación de receptores de membrana.

Daño oxidativo a proteínas. Las ROS pueden causar modificaciones covalentes en los aminoácidos de manera irreversible. No obstante, en algunos casos, como la Cys y Met, las modificaciones son reversibles y constituyen un importante mecanismo de regulación redox permitiendo la activación e inactivación de proteínas. La modificación oxidativa más común es la formación de grupos carbonilos debido a la oxidación de las cadenas laterales de algunos aminoácidos como la Lys (Davies, 1987).

Daño oxidativo a DNA. El daño oxidativo al DNA ha sido menos estudiado. Las ROS, especialmente el $^1\text{O}_2$, el $\cdot\text{OH}$ y los peróxidos de lípidos, pueden ocasionar daño oxidativo al DNA, produciendo la rotura de la doble hélice, así como la oxidación de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas. Las modificaciones oxidativas del DNA favorecen las mutaciones, fenómeno que puede ser importante en la regulación de la expresión génica (Wiseman y Halliwell, 1996; Evans y cols, 1999).

1.5. Especies reactivas de nitrógeno y estrés nitrosativo

Los ecosistemas terrestres y acuáticos liberan NO_x , siendo estos gases la mayor causa natural de degradación de la capa de ozono (Kramlich y Linak, 1994). Entre estos gases, el NO fue considerado tóxico hasta que fue identificado en mamíferos como segundo mensajero del sistema cardiovascular, inmune y nervioso (Ignarro, 1990). Además de ser una molécula señal, tiene función reguladora, citoprotectora y también citotóxica (Gow y Ischiropoulos, 2001). En plantas, la producción endógena de NO fue demostrada por primera vez en soja (Keppler, 1979) y posteriormente se comprobó que ocurre en todas las especies vegetales (Wildt y cols, 1997).

El NO es un gas lipofílico, ligeramente soluble en agua, por lo que puede moverse por el citoplasma celular y difundir a través de las membranas. La pérdida de un electrón de la molécula de NO genera el ión nitrosonio (NO^+) y, la adición de un electrón, el ión nitroxilo (NO^-). Además, el NO es un radical libre, lo que le confiere gran reactividad con el O_2 , radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, metales de transición y otros derivados nitrogenados. Su reacción con el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ genera peroxinitrito (ONOO^-). Al igual que las ROS, las RNS tienen un doble efecto sobre las células, pudiendo producir daño o actuando como moléculas señal en función de su concentración y el estado redox (Beligni y Lamattina, 1999).

Como moléculas señal, intervienen en procesos relacionados con el crecimiento y el desarrollo de la planta, la dormancia y germinación de las semillas, la muerte celular programada, la defensa frente a patógenos y en la respuesta a distintos estreses abióticos (Delledonne, 2005). La señalización mediante NO tiene lugar por distintos mecanismos involucrando cambios en la expresión génica (Besson-Bard y cols, 2008). Algunos de ellos son: la formación de complejos NO-metal, regulando la actividad de factores de transcripción y enzimas; la nitrosilación reversible de los grupos tiol de las Cys de proteínas; nitración de Tyr por el ONOO^- o NO_2 ; y el control de la homeostasis del Ca^{2+} mediante la regulación de sus canales de entrada, lo que permite la modulación de proteínas implicadas en la transducción de señales. En plantas, la formación endógena de NO endógena tiene lugar mediante mecanismos no enzimáticos y enzimáticos (**Fig. 5**).

Producción no enzimática. Ésta tiene lugar mediante reacciones químicas entre los NO_x y los carotenoides en presencia de luz (Durner y Klessing, 1999). También puede formarse NO por reducción del nitrito (NO_2^-) en las mitocondrias (Planchet y cols, 2005) o en el apoplasto a pH ácido (Bethke y cols, 2004).

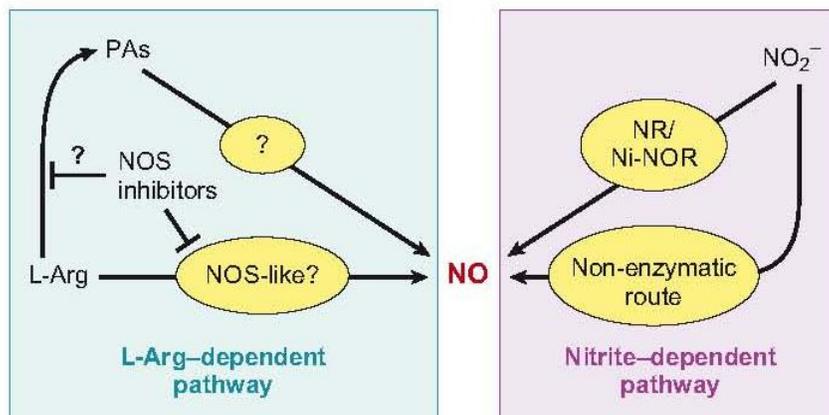


Figura 5. Posibles rutas para la síntesis de NO en plantas (Besson-Bard y cols, 2008).

Producción enzimática. La generación enzimática puede tener lugar por una vía dependiente de NO₂⁻ y otra dependiente de L-arginina. En la vía dependiente de NO₂⁻, la nitrato reductasa (NR) participa en la reducción del NO₂⁻ usando el NAD(P)H como donador de electrones. La actividad NR está regulada por su estado de fosforilación. Por otra parte, se ha identificado la existencia de una nitrito-NO reductasa (Ni-NOR). Esta enzima es exclusiva de raíces y su actividad está coordinada con la NR del citosol. La Ni-NOR está implicada en procesos de desarrollo de la raíz, respuesta a distintos estreses y en la simbiosis (Besson-Bard y cols, 2008). La producción de NO dependiente de Arg implica la existencia de enzimas óxido nítrico sintasas (NOS), que catalizan la conversión de Arg a L-citrulina mediante una reacción dependiente de O₂ y NADPH. En plantas no se han identificado estas enzimas. Sin embargo, estudios de inmunolocalización han permitido detectar proteínas con características similares a las NOS de mamíferos en la matriz de peroxisomas y mitocondrias (Barroso y cols, 1999).

La producción excesiva e incontrolada de RNS puede tener un efecto tóxico en las células, que se conoce como estrés nitrosativo y que se puede diagnosticar por la acumulación de proteínas y otras moléculas nitradas. Además de nitraciones, el estrés nitrosativo puede causar la inhibición de la síntesis de proteínas y del DNA, alteraciones en la concentración intracelular de glutatión (GSH) y ATP, y oxidación de lípidos de membrana y ácidos grasos poliinsaturados libres. Los estudios sobre estrés nitrosativo en plantas son limitados y se centran principalmente en el efecto del NO y del ONOO⁻ (Corpas y cols, 2006). Se sabe que en plantas, al igual que ocurre en animales, el NO interactúa con las ROS en respuesta a distintas condiciones fisiológicas y de estrés como

son la respuesta defensiva frente a patógenos, muerte celular programada, altas temperaturas o estrés osmótico y salino (Garcés y cols, 2001; Gould y cols, 2003; Zaninotto y cols, 2006).

1.6. Sistemas antioxidantes

Las células vegetales poseen diversos mecanismos de defensa que controlan los niveles de ROS favoreciendo el equilibrio redox celular y evitando el riesgo de estrés oxidativo y nitrosativo. La producción de ROS en situaciones de estrés se regula mediante adaptaciones morfológicas, fisiológicas y/o mecanismos moleculares (Mittler, 2002). Por otro lado, las células vegetales poseen un amplio sistema antioxidante que elimina o previene la formación de ROS. Los sistemas antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos más importantes se indican en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Principales sistemas antioxidantes en plantas.

Sistemas antioxidantes	
Enzimáticos	No enzimáticos
Superóxido dismutasa	Antioxidantes liposolubles
Catalasa	<i>β-Caroteno</i>
Enzimas del ciclo ascorbato-glutatión	<i>Zeaxantina</i>
<i>Ascorbato peroxidasa</i>	<i>α-Tocoferol</i>
<i>Monodeshidroascorbato reductasa</i>	Flavonoides y polifenoles
<i>Deshidroascorbato reductasa</i>	Antioxidantes hidrosolubles
<i>Glutatión reductasa</i>	<i>Ascorbato</i>
Tiol peroxidasas	<i>(Homo)glutatión</i>
Guaiacol peroxidasas	

1.6.1. Antioxidantes enzimáticos

Tiol peroxidasas: peroxirredoxinas y glutatión peroxidasas. Las peroxirredoxinas (PRXs) son una familia de proteínas homodiméricas que catalizan la reducción de H₂O₂ a H₂O y de los hidroperóxidos orgánicos a los correspondientes alcoholes, utilizando tiorredoxinas y glutarredoxinas como dadores de electrones. La actividad PRX depende de la existencia de al menos una Cys en el centro catalítico de la enzima (Dietz, 2003). Las PRXs se encuentran en el citosol, plastidios, mitocondrias y núcleo. Las glutatión peroxidasas (GPXs) son proteínas monoméricas que catalizan la reducción de hidroperóxidos orgánicos utilizando GSH como reductor. Las GPXs utilizan preferiblemente tiorredoxinas en vez de GSH como reductor (Navrot y cols, 2006), por lo

que se ha propuesto que las GPXs son una clase de PRXs. Existen diversas isoformas de GPXs localizadas en el citosol, plastidios y mitocondrias.

Superóxido dismutasas. Las SODs son una familia de metaloenzimas presentes en todos los organismos aerobios. Constituyen una de las defensas primarias frente a las ROS debido a que catalizan la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . Hay distintos tipos de SODs en función del cofactor metálico presente en su centro activo: CuZnSOD, FeSOD y MnSOD. Todas ellas están codificadas por el genoma nuclear y se sintetizan en el citoplasma, pero difieren en su localización subcelular. La CuZnSOD es un homodímero de 30-33 kDa presente en el citosol y cloroplastos (Kanematsu y Asada, 1990). La FeSOD es una proteína homodimérica de 45-50 kDa que se encuentra en los cloroplastos y citosol (Moran y cols, 2003; Rubio y cols, 2007). La MnSOD es una enzima tetramérica de 80-90 kDa, localizada en mitocondrias, peroxisomas y bacteroides de los nódulos (Bowler y cols, 1994; Rubio y cols, 2007).

Catalasa. Las catalasas de plantas son hemoproteínas tetraméricas de *c.* 220 kDa cuyas subunidades están codificadas por genes nucleares. Catalizan la reducción de H_2O_2 a H_2O en peroxisomas y glioxisomas, orgánulos en los que hay una elevada producción de H_2O_2 . Las catalasas tienen baja afinidad por el H_2O_2 , de modo que sólo son eficientes a altas concentraciones de su sustrato (Dalton, 1995).

Enzimas del ciclo ascorbato-glutatión. Este ciclo constituye una protección antioxidante esencial de las células ya que regula la concentración de H_2O_2 en cloroplastos, citosol, mitocondrias y peroxisomas (Hernández y cols, 2001). En este ciclo están implicadas cuatro enzimas: ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MR), deshidroascorbato reductasa (DR) y glutatión reductasa (GR). La APX cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O utilizando como poder reductor el ascorbato, que a su vez es oxidado a monodeshidroascorbato (MDHA). El MDHA es reducido de nuevo a ascorbato por la acción de la MR, que usa el NADH como poder reductor. El MDHA se oxida espontáneamente a deshidroascorbato (DHA), el cual es reducido por la DR utilizando GSH como poder reductor. El glutatión oxidado (GSSG) es reducido de nuevo por la acción de la GR que emplea NADPH como reductor.

1.6.2. Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos se encuentran en todos los compartimentos celulares, siendo los más importantes los carotenos, el α -tocoferol, los flavonoides, el ascorbato y el GSH. Los antioxidantes liposolubles se encuentran en las membranas celulares y las protegen de la peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge, 2007). Algunos de los más importantes son el β -caroteno, la zeaxantina y el α -tocoferol (vitamina E). El β -caroteno es un pigmento fotosintético que elimina el $^1\text{O}_2$ generado en el fotosistema II. La zeaxantina forma parte del ciclo de las xantofilas cuya función es disipar el exceso de energía de excitación en condiciones de alta intensidad lumínica. El α -tocoferol se encuentra en las membranas tilacoidales y su función es inactivar el $^1\text{O}_2$ e interrumpir la peroxidación lipídica de las membranas. Los flavonoides y otros compuestos polifenólicos eliminan los radicales peroxilos producidos en las membranas durante la peroxidación de lípidos (Matamoros y cols, 2003). El ascorbato y el GSH son los antioxidantes no enzimáticos hidrosolubles más abundantes en la célula y constituyen los sustratos del ciclo ascorbato-glutatión, por lo que se describen con más detalle en los siguientes apartados.

Ascorbato. El ascorbato (vitamina C) es el antioxidante no enzimático hidrosoluble más abundante en plantas, siendo en hojas incluso más abundante que la clorofila. (Noctor y Foyer, 1998). Desempeña un gran número de funciones fisiológicas, aunque su importancia radica en sus propiedades como antioxidante, participando en el ciclo ascorbato-glutatión o reaccionando directamente con las ROS. También actúa como antioxidante secundario, reduciendo la forma oxidada del α -tocoferol y actuando como cofactor de la violaxantina de-epoxidasa, que interviene en el ciclo de las xantofilas. Además de su importante función como antioxidante, el ascorbato está implicado en la síntesis de hormonas (cofactor de las dioxigenasas), en la regulación del crecimiento (cofactor de las prolina-hidroxilasas) y en la elongación de la raíz y división celular, así como en la señalización redox (Noctor y Foyer, 1998).

Glutatión. El GSH es el tripéptido tiólico ($\gamma\text{Glu-Cys-Gly}$) más abundante en plantas. Sin embargo, algunas especies pueden contener, además o en lugar de GSH, otros tripéptidos relacionados estructuralmente con el GSH, donde el aminoácido terminal Gly es sustituido por βAla , Ser o Glu. En el primer caso, el tripéptido ($\gamma\text{Glu-Cys-}\beta\text{Ala}$) se denomina homoglutatión (hGSH) y es exclusivo de leguminosas. La función del GSH

como antioxidante reside en el grupo tiol de la Cys, que al oxidarse establece un puente disulfuro con el grupo tiol de una segunda molécula de GSH, dando lugar a su forma oxidada (GSSG). Además de actuar como molécula antioxidante eliminando directamente el radical $O_2^{\cdot-}$ y participando en el ciclo ascorbato-glutación, el GSH está implicado en otras funciones vitales para la planta como son el transporte y almacenamiento del S, la desintoxicación de xenobióticos (al funcionar como sustrato de las glutación-S-transferasas) y metales pesados (actuando como sustrato de las fitoquelatina sintasas). Por otra parte, el GSH está implicado en procesos morfogénéticos, en la regulación de la división celular y en el mantenimiento del estado redox celular (Noctor y Foyer, 1998; Matamoros y cols, 2003). El GSH también puede reaccionar con el NO formando nitrosoglutación (GSNO), un reservorio y donador endógeno de NO en las células. Existe, además, una nitrosoglutación reductasa (GSNOR) con una secuencia de aminoácidos conservada en animales, plantas y bacterias que cataliza la oxidación del GSNO a GSSG y NH_4^+ (Besson-Bard y cols, 2008).

1.7. Biosíntesis de glutación y homoglutación

La síntesis de GSH y hGSH tiene lugar en dos pasos dependientes de ATP (**Fig. 6**). La primera reacción es común y está catalizada por la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ ECS) que produce γ -glutamilcisteína (γ EC) a partir de Glu y Cys. En una segunda reacción, la glutación sintetasa (GSHS) añade una Gly al extremo C-terminal del grupo carboxilo de la γ EC para formar GSH, o la homoglutación sintetasa (hGSHS) añade una β Ala para formar hGSH.

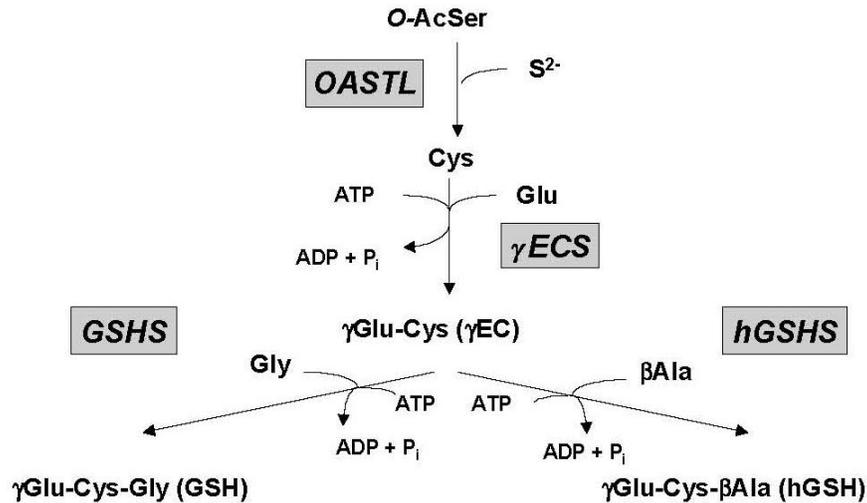


Figura 6. Síntesis del GSH y hGSH. O-AcSer, o-acetilserina; OASTL, o-acetilserina(tiol)liasa.

Existen pocos estudios sobre la regulación de estos genes y en ocasiones los datos son contradictorios. Los cultivos celulares de *A. thaliana* tratados con metales pesados muestran una rápida acumulación de GSH; sin embargo, la expresión de la γ ECS y GSHS no varían. Por otro lado, tratamientos con metales que favorecen la movilización de GSH para sintetizar fitoquelatinas aumentan la transcripción de los genes γ ECS y GSHS en *Brassica juncea* (May y cols, 1998). En *M. truncatula*, la síntesis de GSH, pero no la de hGSH, está regulada por NO (Innocenti y cols, 2007).

1.8. Hemoglobinas y especies reactivas de nitrógeno

El NO puede unirse con gran avidez al grupo hemo de las Hbs. Debido a esta propiedad, estas proteínas podrían jugar un importante papel en la adaptación y protección de las células vegetales frente al estrés nitrosativo (Fig. 7). Se ha identificado nitrosil-Lb (LbNO) en nódulos de soja (Mathieu y cols, 1998) y se ha propuesto que las Lbs estarían implicadas en la modulación de los niveles de NO y ONOO⁻ en los nódulos (Herold y Puppó, 2005). Por otra parte, las GLB1 forman NO₃⁻ a partir de NO. Estudios con plantas o células transgénicas de *A. thaliana* y alfalfa indican que la resistencia al estrés nitrosativo aumenta cuando se sobreexpresa el gen *GLB1*, mientras que las plantas con el gen suprimido son más sensibles a aquellos estreses en los que hay aumento en la producción de RNS, como es el caso de la hipoxia (Hunt y cols, 2002; Dordas y cols, 2003a; Perazzolli y cols, 2004). En plantas de *L. japonicus* la expresión del gen *GLB1-1*

se incrementa en respuesta a la simbiosis con *M. loti*, pero no cuando interacciona con microorganismos patógenos, por lo que se ha propuesto que la GLB1-1 elimina el exceso de NO producido en la respuesta inicial a la infección, permitiendo que se establezca la simbiosis (Nagata y cols, 2008).

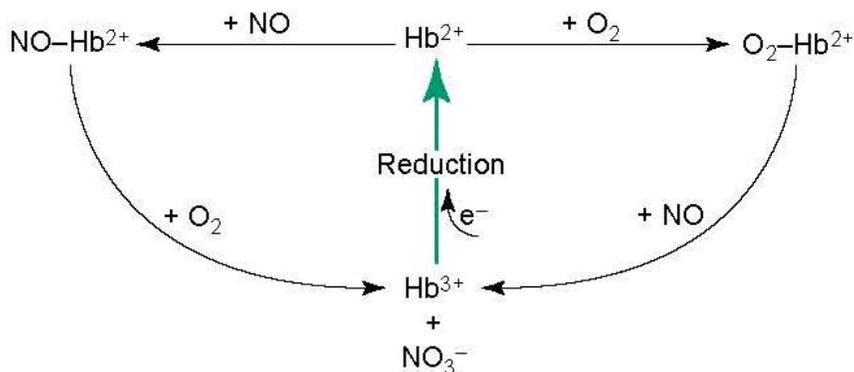


Figura 7. Destoxificación de NO por las hemoglobinas (Kundu y cols, 2003).

1.9. Estrés en plantas

Las plantas están expuestas a constantes cambios en el medio que actúan como estímulos externos y desencadenan cascadas de señalización; a su vez, éstas determinan que la planta responda y se adapte a las condiciones del medio o, por el contrario, que la planta muera (Scandalios, 2005). Los estreses pueden ser abióticos, bióticos o xenobióticos. Todos ellos pueden inducir la formación de ROS y/o RNS, y por lo tanto dar lugar, potencialmente, a un estrés oxidativo y/o nitrosativo (Smirnoff, 1993; Mittler, 2002). En la naturaleza, los factores estresantes actúan conjuntamente, existiendo un agente primario, que actúa con mayor intensidad y da lugar a cambios en la morfología, metabolismo y desarrollo de la planta, y agentes secundarios, que contribuyen al debilitamiento de la vitalidad de la planta (Lichtenthaler, 1996). Los distintos estreses que actúan sobre una planta pueden interactuar entre sí mediante relaciones sinérgicas, antagónicas o de solapamiento (Chapin y cols, 1987; Valladares y Percy, 1997).

El efecto de los estreses sobre la planta depende de las características genéticas inherentes a la especie y variedad, del tipo de estrés, de su duración e intensidad, y de la predisposición metabólica y fisiológica en el momento en el que comienza a actuar el agente desfavorable. Todas estas características determinan el umbral de tolerancia a un determinado estrés. En las respuestas de las plantas se puede distinguir una fase inicial, en

la que se producen modificaciones metabólicas rápidas (minutos), proceso que se conoce como aclimatación. En el caso de que el factor desfavorable prevalezca en el medio, la respuesta primaria desencadena una cascada de señalización secundaria mediada por moléculas como las hormonas, ROS o RNS, desencadenándose una segunda respuesta de “adaptación”. Estas adaptaciones implican cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, de modo que al depender de activaciones génicas son cambios más lentos (horas e incluso días) (Lichtenthaler, 2003). A pesar de esta capacidad de respuesta, la intensidad del estrés puede sobrepasar el umbral de tolerancia de la planta, ocasionando limitaciones metabólicas, daño oxidativo o nitrosativo, e incluso muerte celular. En el caso de plantas cultivadas, las condiciones ambientales suponen un factor importante que limita la productividad de los cultivos. La sequía y la salinidad son los dos tipos de estrés más limitantes en la producción agrícola en el mundo (Vinocur y Altman, 2005; Cavalcanti y cols, 2007).

1.9.1. Estrés salino

El crecimiento de la población mundial requiere un aumento en la producción agrícola para poder satisfacer la demanda de alimentos. Este aumento no sólo se basa en una mejora de los cultivos, sino también en un aumento de la superficie cultivable, siendo necesaria la utilización de suelos con características desfavorables, como es el caso de suelos salinos (Kim y cols, 2005), que pueden llegar a limitar y reducir la producción de los cultivos en un 20% (Jiang y Deyholos, 2006). Se ha estimado que *c.* 6% de la superficie terrestre está constituida por suelos salinos y *c.* 20% de las tierras cultivadas están afectadas por salinidad (Qadir y cols, 2006). Además, el incremento anual de suelos salinos se estima en unos dos millones de ha y se espera que la salinización afecte al 50% de las tierras de cultivo en el año 2050 (Vinocur y Altman, 2005). La principal causa de la salinización de los suelos es la irrigación (“salinización secundaria”), cuya práctica en la actualidad es más intensa debido al proceso de desertización del planeta (Sánchez y cols, 2008). La acumulación de sales se produce en la zona más superficial del suelo, pudiendo llegar a alcanzar concentraciones inhibitorias para el desarrollo de la planta (Willadino y Camara, 2003).

La salinización de los suelos afecta a la fisiología de las plantas, distinguiéndose tradicionalmente dos grupos de plantas según su tolerancia: halófitas, que toleran altas concentraciones de sales (en algunos casos 500 mM) y glicófitas, que son sensibles a la

salinidad (con una importante reducción del crecimiento a concentraciones de 10 mM). La salinidad provoca dos estreses primarios: osmótico y tóxico. El estrés osmótico se debe a que la elevada concentración de sal disminuye el potencial hídrico del suelo y por tanto la disponibilidad de agua para la planta. La toxicidad iónica es causada por la elevada concentración de Na^+ y Cl^- , que, además de efectos tóxicos, puede originar deficiencias nutricionales al alterar la homeostasis de otros iones, como K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y NO_3^- (Davenport y cols, 1997).

El estrés salino provoca un aumento de las ROS y en función de su intensidad puede llegar a producir estrés oxidativo (Hernández y cols, 2001; Jungklang y cols, 2004; Sumithra y cols, 2006; Attia y cols, 2008). Distintos estudios han demostrado que el estrés salino produce alteraciones de las enzimas antioxidantes. En hojas de *S. rostrata* y judía tratadas con NaCl aumentó la actividad de las SODs, APX y GR (Jungklang y cols, 2004). En otras leguminosas como la soja verde (*Vigna radiata*) se incrementaron las actividades SOD, catalasa, MR y GR (Sumithra y cols, 2006). También se ha observado que las plantas con mayor respuesta antioxidante presentan mayor tolerancia a la salinidad. Así, las variedades de guisante tolerantes tienen una actividad constitutiva más alta de algunas enzimas antioxidantes (SODs, APX, GR y MR) que los cultivares sensibles (Hernández y cols, 2000).

Mecanismos de respuesta de la planta al estrés salino. Las respuestas fisiológicas de las plantas al estrés salino incluyen la homeostasis iónica, el ajuste osmótico, el balance hídrico y el control de la transpiración, así como cambios estructurales y anatómicos (Willadino y Camara, 2003; Sánchez y cols, 2008). El mantenimiento de la homeostasis iónica requiere mecanismos de eliminación, dilución, compartimentación y selectividad iónica. La **eliminación de sales**, propia de especies halófitas, se lleva a cabo a través de mecanismos tales como las glándulas secretoras (acumulan sal en contra de gradiente), los pelos vesiculares (tricomas especializados que se localizan en la epidermis y que acumulan Na^+ y Cl^- hasta que se rompen por muerte celular) y la abscisión de órganos (acumulan la sal en exceso para luego desprenderse de la planta) (Willadino y Camara, 2003). La **dilución de sales** es un mecanismo presente en especies que carecen de la estrategia de eliminación. Consiste en la acumulación de agua en las células provocando un aumento del tamaño celular. La **compartimentación de sales** puede producirse a nivel de células, tejidos u órganos. A nivel celular, la sal se acumula en las vacuolas mediante

un transportador activo de membrana Na^+/H^+ de tipo antiporte, que utiliza los gradientes electroquímicos de los transportadores activos primarios de membrana (H^+ -ATPasas). A nivel de tejido u órgano se aprovecha el gradiente electroquímico de las H^+ -ATPasas para la absorción y el transporte por el xilema de los iones Na^+ y Cl^- hasta el órgano o tejido de destino, que suele ser el órgano o tejido menos sensible a la salinidad. El *ajuste osmótico* se produce por acumulación de solutos orgánicos e inorgánicos (fundamentalmente prolina, glicinabetaína, sacarosa y polioles) en las células vegetales. Esto provoca un descenso del potencial hídrico de la planta a niveles inferiores al potencial hídrico del suelo, favoreciendo la absorción de agua (Hare y Cress, 1997). Los “solutos compatibles” intervienen no sólo en la osmorregulación sino también en la osmoprotección, al interaccionar con membranas, enzimas y complejos proteicos. La síntesis de estos solutos supone un coste metabólico, ya que el carbono utilizado no es destinado para el metabolismo primario de la planta del cual depende su crecimiento (Willadino y Camara, 2003).

1.9.2. Otros estreses abióticos

Estrés por bajas temperaturas. En las plantas, la tolerancia a bajas temperaturas depende de la especie y es un factor limitante de la productividad agrícola (Novillo y cols, 2004). El efecto sobre el organismo depende de la duración del estrés y del tejido vegetal. El principal efecto del estrés por frío se debe a una pérdida en la fluidez de las membranas que afecta al metabolismo, alterando el transporte de solutos y la cadena transportadora de electrones. Cuando hay un estrés por enfriamiento progresivo, las plantas adaptan la composición de sus membranas aumentando la proporción de ácidos grasos insaturados para evitar la pérdida de funcionalidad de las mismas. Los cambios en la fluidez de la membrana pueden ser la señal que desencadena la respuesta a estrés por frío. En primer lugar, hay un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico que induce los genes de respuesta al frío a través de la activación de una cascada de señalización. Distintos estudios proponen que las ROS (Chinnusamy y cols, 2007) y el ácido abscísico (ABA) participan en esta ruta como señales secundarias (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006; Chinnusamy y cols, 2007). El estrés por bajas temperaturas limita la disponibilidad de agua en las células, de modo que la planta también está sometida a una situación de estrés osmótico.

Hipoxia. La deficiencia de O₂ o hipoxia es habitual en suelos inundados y las plantas pueden responder mediante estrategias muy diferentes: aumentando el consumo de carbohidratos para favorecer el crecimiento de la parte aérea por encima de la zona de inundación; almacenando carbohidratos hasta que desaparezca la situación de estrés; y mediante un consumo mínimo de carbohidratos para mantener un estado metabólico basal (Fukao y Bailey-Serres, 2004). Ante la deficiencia de O₂, las células usan la vía fermentativa para obtener energía. Además de esta vía, otra respuesta celular de adaptación a la hipoxia es el uso de NO₂⁻ como un aceptor de electrones intermediario, que favorece la formación de NO por la acción de la NR (apartado 1.4.2.). El NO es oxidado de nuevo a NO₂⁻ mediante las GLB1. Esta reacción se induce por el aumento de NADH en la célula y la disminución de ATP como consecuencia de la deficiencia de O₂, y permite mantener el estado redox celular y disminuir el etanol y ácido láctico producido por la vía fermentativa (Dordas y cols, 2003b; Igamberdiev y cols, 2004; Sairam y cols, 2009).

1.10. Hormonas

Las hormonas son sustancias químicas producidas por las plantas que participan en el control de los diferentes procesos fisiológicos induciendo o reprimiendo la expresión de genes específicos. Dentro de las moléculas que regulan el crecimiento y desarrollo de la planta, se incluyen las hormonas clásicas [CKs, auxinas, giberelinas (GAs), ABA, etileno] y otras sustancias reguladoras [poliaminas (PAs), ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA)] que también participan en la respuesta a estrés. A diferencia de las hormonas animales, una determinada fitohormona puede ejercer su acción en varios procesos; asimismo, todo proceso está regulado por la acción simultánea de diferentes hormonas, que pueden interactuar por sinergismo, antagonismo o por mecanismos dependientes de la concentración en los que la acción de una fitohormona depende de la concentración de otra. Así por ejemplo, la aplicación exógena de ABA favorece la acumulación de PAs en condiciones de salinidad (Jimenez-Bremont y cols, 2007), mientras que las PAs exógenas inhiben la producción de etileno al bloquear la conversión del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a etileno, reacción catalizada por la ACC sintasa (Apelbaum y cols, 1981).

La participación del NO en diversos procesos de desarrollo de la planta ha llevado a considerarlo una hormona. Numerosos estudios han puesto en evidencia la interacción existente entre el NO y las hormonas en distintos procesos de desarrollo. El ácido indolacético (IAA) es una auxina que favorece la elongación de la raíz. El tratamiento de plantas de maíz (*Zea mays*) con distintos donadores de NO produce la misma respuesta que el IAA (Gouvêa y cols, 1997). En pepino (*Cucumis sativus*), el tratamiento con IAA induce en los hipocotilos un incremento del nivel de NO (Pagnussat y cols, 2002). Se piensa que el IAA induce la formación de NO provocando un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico y desencadenando una cascada de señalización que activa la síntesis de los genes de respuesta a auxinas (Lamattina y cols, 2003). El ABA interviene en el cierre de los estomas para evitar la pérdida de agua en situaciones de estrés salino, hídrico y frío. Trabajos realizados en guisante y haba evidencian que el ABA aumenta la concentración endógena de NO, que es necesario para inducir el cierre de los estomas (García-Mata y Lamattina, 2001). El tratamiento con CKs exógenas favorece la acumulación de algunos pigmentos como la betacianina. El NO ejerce este mismo efecto y, además, los inhibidores de la síntesis de NO bloquean la acumulación de betacianina en plantas tratadas con CKs (Scherer y Holk, 2000).

Las ROS están involucradas en la ruta de señalización de hormonas como segundos mensajeros. La respuesta de la raíz al gravitropismo está mediada por IAA. En maíz, Joo y cols (2001) observaron que, cuando se inhibían los transportadores de auxinas, si las plantas eran tratadas con ROS respondían al gravitropismo, mientras que si se eliminaban las ROS había inhibición de esta respuesta. En cebada, la GA_3 interviene en la muerte de las células de la aleurona, mientras que el ABA inhibe este proceso. Si las plantas son tratadas con GA_3 exógena hay una disminución en la expresión de los genes y en la actividad de la catalasa, APX y SODs, por lo que las células son más sensibles al daño oxidativo. Sin embargo, el tratamiento con ABA induce la expresión y la actividad de la catalasa (Fath y cols, 2001). El H_2O_2 y el etileno intervienen en la formación de los nódulos en la leguminosa acuática *S. rostrata* (D'Haeze y cols, 2003). También las ROS parecen estar implicadas en el cierre de las células estomáticas mediado por ABA, favoreciendo la entrada de Ca^{2+} en el citosol (Pei y cols, 2000).

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

1. Estudio fisiológico, bioquímico y molecular de la respuesta antioxidante de *Lotus japonicus* al estrés salino.
2. Determinación de los mecanismos de regulación de la ruta de biosíntesis de tioles en *Lotus japonicus* en respuesta a óxido nítrico y hormonas.
3. Caracterización estructural y funcional de los genes de las hemoglobinas no simbióticas de *Lotus japonicus*. Este estudio incluye el análisis de la expresión génica en respuesta a óxido nítrico, estrés abiótico y hormonas, así como la localización de los transcritos y de la actividad de los promotores en los nódulos.

3. Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos químicos y bioquímicos

La solución de riego de las plantas se preparó con agua desionizada por ósmosis reversa, y los reactivos químicos empleados fueron de grado analítico (Panreac, Barcelona). Las fases móviles para el análisis HPLC se prepararon con disolventes orgánicos de grado HPLC (Panreac). Los ensayos bioquímicos y de biología molecular se realizaron con agua Mili Q (Millipore, Milford, EEUU). La procedencia de la mayoría de los reactivos bioquímicos fue de la máxima calidad de Sigma-Aldrich-Fluka (St. Louis, EEUU). La referencia de los reactivos de biología molecular empleados figura en el texto entre paréntesis junto a cada producto.

3.2. Material biológico

3.2.1 Plantas

Las semillas de *L. japonicus* cv. MG20 se escarificaron con papel de lija para favorecer la germinación. La localización de las actividades de los promotores de los genes *LjGLB* se llevó a cabo en raíces y nódulos del cv. Gifu, ya que el protocolo de transformación y obtención de plantas compuestas está optimizado para esta variedad. Las semillas de las plantas que iban a ser cultivadas en maceta se esterilizaron en hipoclorito sódico 2% (v/v) durante 20 min y se lavaron con agua desionizada estéril, dejándolas en agua y en

oscuridad durante 24 h para su imbibición; las semillas de las plantas que iban a ser cultivadas en sistema hidropónico o en placa se esterilizaron en una mezcla 1:1 de etanol absoluto y H₂O₂ 9,8 M durante 3 min, se lavaron con abundante agua desionizada estéril, y se dejaron en agua y en oscuridad durante 1 h a 37°C para su imbibición. Posteriormente, las semillas se lavaron con agua desionizada estéril, se transfirieron a placa Petri con agar 0,5% (p/v), se incubaron a 4°C durante 48 h y se germinaron a 28°C en oscuridad durante 48 h.

Para los experimentos realizados en maceta, las plántulas se transfirieron a macetas de 13 cm de diámetro y 11,4 cm de altura, que contenían vermiculita lavada previamente con solución nutritiva B&D (Broughton y Dilworth, 1971; **Tabla 4**). Se usó vermiculita de dos espesores distintos: las tres cuartas partes inferiores de la maceta contenían vermiculita de espesor 1-4 mm y el cuarto superior vermiculita de espesor 0,5-3 mm para favorecer durante los primeros días una humedad adecuada para la raíz. Se transfirieron de 12 a 14 plántulas por maceta. La solución nutritiva B&D fue suplementada con NH₄NO₃ 5 mM ó 0,25 mM para plantas no noduladas y noduladas, respectivamente. Las plantas se regaron dos días por semana.

Tabla 4. Composición de la solución nutritiva B&D para *L. japonicus*.

Nutriente	Concentración (mg/L)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147,05
KH ₂ PO ₄ (pH 6,8)	68,05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	61,65
K ₂ SO ₄	43,50
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,17
H ₃ BO ₃	0,12
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,14
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,05
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,03
Na ₂ MoO ₄	0,03
Sequestrene 330Fe (6% Fe)	25,00

El pH se ajustó a 6,5-6,7 con KOH 2M.

Para los experimentos realizados en cultivo hidropónico y en placa, las plántulas se transfirieron a placa Petri cuadrada de 10 x 10 x 2 cm, que contenía medio sólido

Fahraeus modificado (Boisson-Dernier y cols, 2001; **Tabla 5**). Se transfirieron cinco plantas por placa y se dejaron crecer durante 7 d, momento en el cual, en el caso de los experimentos realizados en sistema hidropónico, se pasaron a contenedores de polipropileno con capacidad para 5 L (33 x 19 x 11 cm). Como medio para el cultivo hidropónico se usaron 4 L de la solución nutritiva B&D diluida cuatro veces en agua desionizada. La solución se renovó cada 3-4 d y fue aireada constantemente utilizando un compresor de aire para acuarios Rena Air 200 (Chalfont, Pensilvania, EEUU) con un caudal de 160 L/h y potencia de 4 w.

En los experimentos realizados en placa, para evitar que la raíz penetrase dentro del agar, se puso sobre la superficie papel de filtro previamente autoclavado.

Tabla 5. Composición del medio sólido para el cultivo de plantas en placas.

Nutriente	Concentración (mL/L)
CaCl ₂ ·2H ₂ O (1 M)	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,5 M)	1,0
KH ₂ PO ₄ (0,7 M)	1,0
Na ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (0,4 M)	2,0
Fe-EDTA (10 mM)	5,0
NH ₄ NO ₃ (1 M)	0,5
MnSO ₄ (1 mg/mL)	0,1
CuSO ₄ (1 mg/mL)	0,1
ZnSO ₄ (1 mg/mL)	0,1
H ₃ BO ₃ (1 mg/mL)	0,1
NaMoO ₄ (1 mg/mL)	0,1

Se añade agar 1,5 % (p/v). EDTA: ácido etiléndiaminotetraacético.

Las plantas crecieron en todo momento en una cámara de ambiente controlado: 23°/18°C día/noche (16 h de fotoperiodo), 70% humedad relativa y 350 μmol/m²s de radiación fotosintéticamente activa, suministrada por una mezcla de lámparas fluorescentes (Sylvania WHO “coolwhite”, 215 w) e incandescentes (Mazda, 60 w).

El material vegetal se cosechó a los 35 d después de la germinación en el caso de plantas no noduladas y a los 45 d en el caso de plantas noduladas, excepto en los experimentos llevados a cabo en placa Petri, en los que la cosecha se realizó a los 15 d de edad de la planta. Para la obtención de flores y frutos, las plantas crecieron hasta los 60 d

de edad. Los frutos se recogieron cuando alcanzaron 3,5 cm de longitud. Salvo que se indique lo contrario, la cosecha se realizó siempre en nitrógeno líquido y el material se conservó a -80°C hasta su análisis.

3.2.2. Microorganismos

Las plántulas de *L. japonicus* se inocularon con *M. loti* bv. R7A. Las bacterias se pusieron a crecer en medio líquido preparado a base de manitol y extracto de levadura (Vincent, 1970; **Tabla 6**) a 125 rpm durante 2 d a 28°C. Las plantas se inocularon a los 7 d de edad desde el momento de la germinación. Se usó 1 mL de inóculo por planta para el cultivo en maceta y 0,5 mL por planta para el cultivo en sistema hidropónico.

Tabla 6. Composición del medio líquido empleado para el crecimiento de rizobios.

Nutriente	Concentración (g/L)
Manitol	10,0
K ₂ HPO ₄	0,1
KH ₂ PO ₄	0,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extracto de levadura	0,4

Se ajustó el pH a 6,5 con azul de bromotimol 5% (p/v) en 2 M KOH.

Los cultivos de *E. coli* bv. DH5α se hicieron en medio líquido Luria-Bertani (LB; **Tabla 7**) a 37°C durante 24 h. En el caso de las células transformadas, se añadió 100 µg/mL ampicilina al medio líquido y las bacterias crecieron a 37°C durante 24 h. La selección de las células transformadas se hizo en placa Petri con medio LB sólido con 100 µg/mL de ampicilina y sobre el que se habían extendido 40 µL de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 100 mM y 40 µL de 40 mg/mL de X-Gal en *N,N*-dimetilformamida. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

Las células de *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334 utilizadas para el estudio de los promotores de *LjGLBs* (apartado **3.14.**) se cultivaron en un medio líquido que contenía 50 g/L de bacto triptona (DIFCO Laboratories, Detroit, EEUU), 5 g/L de extracto de levadura, 8 g/L de NaCl; 12,3 g/L de MgSO₄·7H₂O y 1 mL de Tris-HCl 1M (pH 6,4-6,8) a 28°C durante 2-3 d. La selección de las células de *A. rhizogenes* transformadas con el

vector pGUS-GLB correspondiente se hizo en placa Petri, en el mismo medio que para el cultivo líquido al que se añadió agar 1,8% (p/v) y 50 µL/mL de higromicina (Sigma). Las placas se incubaron a 28°C durante 48 h.

Tabla 7. Composición del medio LB para bacterias.

Nutriente	Concentración (g/L)
Triptona	1,0
Extracto de levadura	0,5
NaCl	1,0

Para el cultivo en medio sólido, se añadió agar 1,5 %.

3.3. Tratamientos

3.3.1. Tratamientos de estrés

Salinidad. Para los experimentos de salinidad se usaron plantas no noduladas que habían crecido en maceta. Se establecieron dos tratamientos de salinización (S1 y S2). En el tratamiento S1, las plantas de 26 d se trataron con NaCl 150 mM (7 d). En el tratamiento S2, las plantas de 15 d se trataron con NaCl 50 mM (6 d), 100 mM (6 d) y 150 mM (6 d). El NaCl se disolvió en la solución nutritiva B&D.

Bajas temperaturas. El tratamiento de estrés por frío se efectuó sobre plantas de 15 d. El tratamiento se realizó durante 24 h a 4°C y en oscuridad (Shimoda y cols, 2005).

Sacarosa. Las raíces de plantas que habían crecido durante 15 d en placas Petri cuadradas se trataron con 1 mL de sacarosa 1% (p/v) y se incubaron en la placa durante 24 h en oscuridad para evitar la producción endógena de sacarosa durante la fotosíntesis. El extremo apical de la raíz (1,5 cm) permaneció sumergido en la solución durante todo el tratamiento.

Hipoxia. El efecto de la disminución de O₂ en el medio sobre la expresión de los genes de las Hbs no simbióticas se hizo en plantas de 15 d. La atmósfera de las placas donde estaban las plantas se aireó durante 5 min con N₂ y a continuación se sellaron con cinta aislante y se colocaron en la oscuridad para evitar la producción de O₂ por la fotosíntesis. La cosecha se realizó a las 24 h del tratamiento.

3.3.2. Hormonas

Los tratamientos se hicieron en plantas de 43 d de edad crecidas en medio hidropónico. Las plantas se trataron durante 48 h con 50 μ M de IAA, GA, ABA, SA, JA, ACC (precursor inmediato del etileno), CKs (mezcla equimolar de kinetina y 6-bencil-aminopurina) o PAs (mezcla equimolar de espermidina, espermina y putrescina).

Las soluciones “stock” de los compuestos (todos de Sigma) fueron: IAA 0,5 M en 400 μ L de NaOH 1 M; mezcla 0,5 M de kinetina y 6-bencil-aminopurina en 200 μ L de NaOH 1 M; 0,1 M de ABA, ACC o SA en 2 mL de etanol absoluto; mezcla 0,1 M de espermidina, espermina y putrescina en 667 mL de etanol absoluto; 0,1 M de GA o JA en 2 mL de dimetilsulfóxido.

3.3.3. Óxido nítrico

El efecto del NO en la expresión de los genes *Hb* se estudió en plantas que crecieron en cultivo hidropónico. Las plantas de 43 d de edad se trataron durante 48 h con nitroprusiato sódico 250 μ M (SNP; Sigma), un donador de NO. Puesto que la liberación de NO a partir del SNP requiere luz, se usaron contenedores transparentes. Debido a que el SNP libera ferricianuro al mismo tiempo que NO, las plantas control se trataron con ferricianuro potásico 250 μ M en la solución nutritiva durante 48 h. Los efectos del NO en la expresión de las Hbs se confirmaron en plantas de 15 d utilizando *S*-nitroso-*N*-acetil-DL-penicilamina (SNAP; Sigma), otro donador de NO. Se aplicó 1 mL de una solución de SNAP 0,5 mM directamente sobre la raíz de cada planta. El efecto del NO se estudió 6 y 24 h después de la aplicación del tratamiento.

3.3.4. Inoculación con rizobios

El efecto de la interacción rizobio-leguminosa en la expresión de las Hbs no simbióticas de *L. japonicus* se analizó en plantas de 15 d. Se hicieron dos tratamientos: con *M. loti* R7A, que establece simbiosis con *L. japonicus*; y con *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* 3622, que establece simbiosis con judía. En ambos tratamientos, se inoculó la raíz de la planta con 1 mL del cultivo líquido, donde había crecido el rizobio correspondiente, con densidad óptica a 600 nm de 0,3 ($\sim 10^{11}$ células/mL). La cosecha se realizó 6 y 24 h después de la inoculación.

3.4. Parámetros fisiológicos

El peso seco (PS) de la parte aérea se determinó tras deshidratación de las muestras en estufa a 60°C durante 72 h. El área foliar se estimó mediante el programa de análisis de imágenes Carnoy 2.1 (Lab of Plant Systematics, Math/Scientific, Mac). El potencial hídrico (Ψ_w) foliar se midió en los trifolios situados en el tercio superior de la parte aérea, 2 h después del inicio del fotoperiodo, mediante una cámara de presión (Soil Moisture Equipment, Santa Bárbara, EEUU).

En el estudio de salinidad, se determinó el contenido de Na, K y Ca en hojas secas y molidas de plantas control, S1 y S2 mediante ICP óptico en el Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC, Murcia).

El contenido de clorofilas *a* y *b* y carotenos se determinó mediante espectrofotometría (Abadía y Abadía, 1993). Los extractos se mantuvieron en oscuridad durante todo el análisis. Las muestras de hojas se homogeneizaron en mortero con 5 mL de acetona que contenía *c.* 1 mg de ascorbato sódico. Los extractos se pasaron a través de un filtro de 0,45 μm (Millipore) y se midió la absorbancia a 616,6, 644,8 y 470 nm. Para la cuantificación de los pigmentos se emplearon las fórmulas de Lichtenthaler (1987).

El contenido de *prolina* se determinó por un método colorimétrico (Bates y cols, 1973) con algunas modificaciones. Se homogeneizaron 100 mg de hojas y 400 mg de raíces en 1 mL de ácido sulfosalicílico al 3% (p/v). Las muestras se centrifugaron (13000g x 20 min, 4°C) y se derivatizaron con ninhidrina. Para ello se mezclaron 0,3 mL de extracto, 0,3 mL de reactivo de ninhidrina (preparado en oscuridad mezclando 30 mL de ácido acético glacial, 20 mL de ácido fosfórico 6 M y 1,25 g de ninhidrina) y 0,3 mL de ácido acético glacial. La mezcla de derivatización se hirvió 1 h y la reacción se detuvo en hielo. Para extraer el complejo cromóforo-prolina se añadió 0,6 mL de tolueno, se agitó en vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 15-20 min para separar la fase orgánica, que contiene la prolina. La absorbancia de la fase orgánica se midió a 520 nm. Para la recta de calibrado se partió de una solución de L-prolina 5 mM, usando un rango de 0-1,5 $\mu\text{mol/mL}$.

La *proteína soluble total* se determinó por el método de Bradford (1976), midiendo la absorbancia a 595 nm tras la reacción con azul de Coomassie G-250. Se utilizó el microensayo de Bio-Rad (Hercules, EEUU), con un calibrado de 0-10 μg de seroalbúmina bovina (Sigma).

3.5. Marcadores de daño oxidativo

El daño oxidativo a lípidos se estimó mediante la cuantificación de malondialdehído, que es capaz de formar aductos con el ácido tiobarbitúrico (TBA) a 95°C y en medio ácido. La extracción se hizo a partir de 90 mg de material vegetal en 300 µL de ácido metafosfórico 5% (v/v) y 6 µL de butilhidroxitolueno 0,04% (p/v). Tras la centrifugación de los extractos (13000g x 20 min, 4°C), las muestras se derivatizaron mezclando 100 µL de extracto, 10 µL del medio de extracción, butilhidroxitolueno 2% en metanol, TBA 1% (p/v) en NaOH 50 mM y HCl 25%. Se hizo un blanco general y un blanco de muestra al que se añadió 50 µL de NaOH 50 mM en lugar de TBA; se incubó durante 30 min a 95°C y se paró la reacción en hielo. El aducto (TBA)₂-malondialdehído se extrajo añadiendo butanol en dos etapas (100 y 80 µL, respectivamente), centrifugando entre cada una de ellas (3000g x 1 min, 4°C) para recoger el sobrenadante. Posteriormente, la muestra se liofilizó y se almacenó a -80°C hasta su análisis, momento en el cual se resuspendió en 60 µL de fase móvil [tampón fosfato (KP) 5 mM (pH 7); acetonitrilo 15% (v/v); tetrahidrofurano 0,6% (v/v)], se filtró a través de un filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm (Millipore) y se inyectaron 50 µL. El análisis se llevó a cabo con un flujo de 1 mL/min en un sistema HPLC (Waters, Milford, EEUU) equipado con detector de fotodiodos (PDA996), controlado por software Millennium³² (Waters), usando una columna C₁₈ de 4,6 x 250 mm, 5 µm y 120 Å (Bakerbond; Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, EEUU). El calibrado se hizo con 1,1,3,3-tetraetoxipropano en un rango de 0-1 nmol.

Para determinar el daño oxidativo a proteínas se utilizó el kit comercial “OxyBlot protein oxidation” (Chemicon, Temecula, EEUU), basado en la reacción de los grupos carbonilos con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar 2,4-dinitrofenilhidrazonas. Las muestras de hojas y raíces (200 mg) se homogeneizaron en 200 µL de KP 100 mM (pH 7), Triton X-100 0,1% (v/v), EDTA 0,1 mM y β-mercaptoetanol 2% (v/v). Los extractos se centrifugaron (13000g x 20 min, 4°C), se derivatizaron con DNPH y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. En el caso de hojas, se modificaron las cantidades indicadas en las instrucciones del “OxyBlot protein oxidation kit” (**Tabla 8**). Tras la derivatización, las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (Laemmli, 1970) y se transfirieron a membrana de polivinilideno PVDF (apartado 3.7.). La detección se realizó usando un anticuerpo primario “anti

DNP-hidrazonas de conejo” [1:150 en tampón tris-tween salino (TTBS): Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 0,5 M, Tween-20 0,05% (v/v)] que reconoce los grupos dinitrofenilhidrazona de las proteínas oxidadas, y un anticuerpo secundario “anti-conejo conjugado con la peroxidasa de rábano” [1:3000 en leche al 5% (p/v) en TTBS]. La inmunodetección se hizo por quimioluminiscencia con el kit “Supersignal West Pico Chemiluminiscent substrate” (Pierce, Rockford, EEUU).

Tabla 8. Derivatización de proteínas de hojas con DNPH.

Reactivo	Muestra (μL)	Blanco de muestra (μL)
Extracto	3	3
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 12%	3	3
DNPH 1X	6	-
Solución control de derivatización 1X	-	6
Solución de neutralización	4,5	4,5

3.6. Análisis de la expresión génica

3.6.1. Extracción de RNA

Para la extracción del RNA total, el material fue previamente autoclavado a 120°C durante 30 min. El material no autoclavable se esterilizó con NaOH 1 M. La extracción se realizó usando el sistema comercial “RNAqueous Isolation Kit” (Ambion, Austin, EEUU). Para ello, 70 mg de muestra se homogeneizaron con 300 μL de la mezcla “Lysis Binding Solution:Plant RNA Isolation Aid” en una proporción 8:1. El RNA aislado se precipitó con 50 μL de LiCl durante toda la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugó (13000g x 20 min, 4°C), se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol 80%. Se dejó secar y el RNA se trató con DNasaI durante 30 min a 37°C. La mezcla de reacción contenía 1 μL de DNasaI (Roche, Penzberg, Alemania), 4 μL de tampón H 12x, 5 μL de inhibidor de RNasa 40 U/μL (Roche) y 44,5 μL de agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato. Para inactivar la DNasaI se añadieron 5 μL de “DNase Inactivation Reagent” (Ambion). La ausencia de contaminación con DNA genómico se comprobó mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), utilizando oligonucleótidos del gen *ubiquitina* (**Tabla 9**). Una vez extraído el RNA se guardó a -80°C hasta su uso.

3.6.2. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se incubó 20 µL de RNA (1 µg) con 2 µL de oligo-(dT)₁₇ 10 µM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) durante 5 min a una temperatura entre 65-70°C. La mezcla de RNA con oligo dT se incubó con 10 µL de “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase” (MMLV-RT; Promega, Madison, EEUU) 5x, 1,5 µL de dNTPs (Invitrogen) 25 mM, 15,5 µL de agua desionizada autoclavada tratada con dietilpirocarbonato y 1 µL MMLV-RT, durante 1 h a 42°C. El cDNA sintetizado se cuantificó mediante qRT-PCR usando *ubiquitina* como gen control (**Tabla 9**), como se describe en el siguiente apartado.

3.6.3. Cuantificación de mRNA mediante qRT-PCR

El análisis qRT-PCR se efectuó con un equipo iCycler iQ (Bio-Rad). Los oligonucleótidos se diseñaron por medio de Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, EEUU). Se utilizó cDNA con un mismo C_t (“threshold cycle”) para la *ubiquitina*, siendo éste siempre <20 ciclos. La mezcla de reacción contenía 10 µL del reactivo iQ SYBR-Green Supermix (Bio-Rad), 5 µL mezcla oligonucleótidos (sentido-antisentido) 3 µM (**Tabla 9**), 4 µL agua desionizada estéril y 1 µL cDNA.

El programa de PCR consistió en un primer paso de desnaturalización del cDNA y activación de la *Taq* polimerasa a 95°C durante 5 min, seguido de 50 ciclos a 95°C durante 15 s, y un último paso de 1 min a 60°C. La especificidad de los oligonucleótidos se determinó usando la curva de desnaturalización. Los datos se normalizaron frente a la *ubiquitina* y se expresaron de forma relativa a los niveles de mRNA de las muestras control, a las que se les asignó el valor de 1, usando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). La estabilidad de la *ubiquitina* en los tratamientos estudiados se confirmó analizando su expresión frente a otros dos genes control: *PP2A*, que codifica la subunidad catalítica de la proteína-fosfatasa 2A (Sánchez y cols, 2008), y *eIF4A3*, que codifica el factor de elongación eucariótico 4A (Shimoda y cols, 2005).

Tabla 9. Oligonucleótidos (5'→ 3') empleados para los análisis de expresión génica.

Gen	Identificador	Sentido	Antisentido
<i>Ubiquitina</i>	DQ249171	TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC	AACAACAGCACACACAGACAA
<i>eIF4A3</i>	TC24394	CACGGATGACATGGACTTCGA	GCTTCCAATCGCCTTAACACC
<i>PP2A</i>	TC41905	TGAGCTATGTGAAGCTGTTGGT	CAGCCTCATTATCACGCAGTAG
<i>MnSOD</i>	AY274807	CCTCAGCCGTCGTAAAGCTC	GACCTCCGCCATTGAATTTG
<i>FeSODc</i>	AY525603	GGTTGCAAAATCTCAGCTTGC	GCTGGAGTGACTTTTGGACCC
<i>FeSODp</i>	AY525601	TCGCCATCCACTTCCACTACT	GAAACGCGGAAGGTGATGAT
<i>CuZnSODc</i>	AY257198	TGAACAATGGTGAAGGCTGTG	CCTTGACATTATCGCTGCTGC
<i>CuZnSODp</i>	AP010457	GATGGAGTCGCAGAGGCAAC	GGCCAGTGAGTGGAATCTGAC
<i>Catalasa</i>	TC20811	GCGCCTGACAGGCAAGATA	TGCCCAAGAGAACGATCAGC
<i>APXc</i>	TC23988	AAGGCCAGGAGAAAGCTCAGA	AGCAGAGTGCCATGCCAAA
<i>APXpx</i>	TC22241	TCTACCAATGAAGGACGGCTTC	TGTCAGTCAAGCCCATTTCGAT
<i>APXs</i>	TC20749	GCTCCTCTCCTCGCATTTCCTC	CCTCAGCTCTCCCCTGATTG
<i>APXt</i>	TC24975	TGCCAAACTTAGCAACCTTGG	CCAGCATTGGAGCACCAT
<i>GRc</i>	TC24724	TGTCACCATGAGGACTCCCA	TCAGAAGGTTGGCTCTTTCGA
<i>GRp</i>	TC21858	GTGCCGCTAGGTTTTCATCAA	GCTCACAAATCCCCACCTTG
<i>MRpx</i>	TC33358	AACATGTTGACCATGCTCGC	TGATGGCCTTCACAGCCTG
<i>MRp</i>	TC34359	GCTCCTGCCTAAACTTGCCAG	AGTTTGGCTTTGTCAACCGG
<i>DRc</i>	TC24095	CGTTCTCATCCTTCATCGCA	CATGAGGAGCACCAACAGCA
<i>DRp</i>	TC31996	CGTTTCACCCAAGTCTTCA	GACACCCTGAGAGGCTTCTG
<i>γECS</i>	AY204516	ATGCTGCCCTTTGTTTTTG	AACACCTCCGCTACCTCAT
<i>hGSHS</i>	AY219337	ATGGGGGTAGGTGGATGT	CAGTAACTTTCAGGTAATGG
<i>GSHS</i>	AF279703	TGGCTCAACAACAACAACAT	GTGACAAGACTCCCTAAACCA
<i>GLB1-1</i>	TC24940	TCTCACTTCACTTCCATCGCA	TCAGTGAAACATGTGCTCCCA
<i>GLB1-2</i>	AB238221	GGCAGAAAACACAACCACCAT	TCACCACCAGAGCTTCTTGCT
<i>GLB2</i>	TC22194	AAGAAGCCCTGCTGAAAACGT	TCCTCGCTCCATTTATCTCCC
<i>GLB3-1</i>	TC39169	GAGTGGAGTTCTCACATCCAAC	GTTTGAAGGCCGAGCTTTTCA
<i>GLB3-2</i>	GO024600	GGAACCATTACGGTACATTTCG	GCATCTCTCAAACGACACAGCC

3.7. Electroforesis y análisis *western blot*

3.7.1. Electroforesis

La proteína total se extrajo a partir de 50 mg de material vegetal y 150 μ L de KP 50 mM (pH 7,8), Tritón X-100 1% y EDTA 0,1 mM. El extracto se centrifugó (13000g x 15 min, 4°C) y se cuantificó la proteína soluble (apartado 3.5.4) para uniformizar la carga de los pocillos del gel (25-50 μ g en hojas y 5-40 μ g en raíces). Las muestras se mezclaron con el tampón de carga [Tris-HCl 62 mM (pH 6,8), SDS 2,3%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,1%] en una proporción muestra-tampón 4:1 y se hirvieron durante 5 min. Posteriormente las muestras se enfriaron en hielo y se cargaron 20 μ L en cada pocillo. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS de acrilamida: bisacrilamida al 12,5% para la fase separadora y 4,6% para la concentradora (**Tabla 10**), con 0,75 mm de espesor. Se utilizó el sistema Mini-Protean III (Bio-Rad). La electroforesis se realizó a 100 V, usando Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y SDS 1% como tampón.

Tabla 10. Composición de los geles concentrador y separador para SDS-PAGE.

Reactivo	Gel concentrador ^a	Gel separador ^a
Acrilamida:bis-acrilamida (40% T, 3% C) ^b	0,115 mL	2,190 mL
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), SDS 0,4%	-	2,330 mL
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), SDS 0,4%	0,285 mL	-
H ₂ O	0,600 mL	2,480 mL
Persulfato amónico 10%	5 μ L	38,89 μ L
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiléndiamina (TEMED)	1 μ L	7,78 μ L

^a Se indican los volúmenes necesarios para la preparación de un gel. Se utilizó 3,5 mL del gel separador y 1 mL del gel concentrador.

^b T=[g acrilamida+g bis-acrilamida]/volumen total]x100. C=[g bis-acrilamida/(g acrilamida+g bis-acrilamida)]x100.

3.7.2. Transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno

Una vez separadas las proteínas en el gel de electroforesis, se transfirieron a una membrana Bio Trace PVDF (Pall Life Sciences, Pensacola, EEUU) con el sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad) a 100 V durante 1,5 h. El tampón de transferencia fue Tris-HCl

25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%. Para comprobar que las proteínas se habían transferido uniformemente, la membrana se tiñó con Ponceau.

3.7.3. Análisis *western blot*

La membrana se bloqueó en leche desnatada al 5% en TTBS durante toda la noche a 4°C. Seguidamente, se hicieron tres lavados de 15 min con TTBS y se incubó con la dilución correspondiente del anticuerpo primario (**Tabla 11**) durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo la membrana tres veces durante 15 min con TTBS y se incubó con el anticuerpo secundario “anti-conejo conjugado con la peroxidasa de rábano” [Sigma; 1:20000 en leche 5% en TTBS], y en el caso de la deshidroascorbato reductasa citosólica (DRc) con “anti-cobaya conjugado con la peroxidasa de rábano” [Sigma; 1:10000 en leche 5% en TTBS] durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación con el segundo anticuerpo, se realizaron un par de lavados en TTBS y se detectaron las proteínas sobre la membrana por quimioluminiscencia usando el reactivo “Supersignal West Pico Chemiluminiscent substrate” (Pierce).

Tabla 11. Procedencia de los anticuerpos policlonales. c: citoplasmática; p: plastidial

Proteína	Especie	Procedencia	Dilución
MnSOD	<i>Spinacia oleracea</i>	Kanematsu y Asada, 1990	1:3000
FeSOD	<i>Vigna unguiculata</i>	Moran y cols, 2003	1:1000
CuZnSODp	<i>Oryza sativa</i>	Kanazawa y cols, 2000	1:3000
Catalasa	<i>Cucurbita maxima</i>	Yamaguchi y Nishimura, 1984	1:1000
APXc	<i>Glycine max</i>	Dalton y cols, 1998	1:1000
DRc	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Eltayeb y cols, 2006	1:10000
DRp	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Dietz (Bielefeld, Alemania)	1:3000

3.8. Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas se determinaron usando un espectrofotómetro ultravioleta/visible Beckman Coulter DU730 (Beckman Coulter, Fullerton, EEUU) o Perkin Elmer Lambda 25 (Perkin Elmer, Waltham, Massachussets, EEUU). En general, las enzimas se extrajeron en tubos Eppendorf en baño de hielo, los extractos se centrifugaron a 13000g durante 20 min a 4°C, y las actividades enzimáticas se ensayaron

en el sobrenadante mediante métodos espectrofotométricos a 25°C en la fase de linealidad.

3.8.1. Superóxido dismutasa

La actividad SOD se determinó mediante un método basado en la inhibición de la reducción del ferricitocromo *c* por los $O_2^{\cdot-}$ generados por un sistema xantina/xantina oxidasa (McCord y Fridovich, 1969). Se homogeneizaron hojas (40 mg) y raíces (200 mg) con 100 μ L del medio de extracción que contenía KP 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, polivinilpirrolidona (PVP-10) 1% (p/v) y Triton X-100 0,1%. Los extractos se centrifugaron y la actividad SOD total se determinó añadiendo 15 μ L del sobrenadante a un medio que contenía 1 mL de solución generadora de $O_2^{\cdot-}$ [KP 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM y xantina 0,1 mM; tras oxigenar este medio durante 10 min se añadió ferricitocromo *c* 14 μ M], 20 μ L de 0,5 mM KCN, y la suficiente xantina oxidasa [15-20 μ L; diluida 1:50 en KP 50 mM (pH 7,8)] para producir un aumento de la absorbancia de 0,050/min, completando con KP 50 mM (pH 7,8) hasta un volumen final de 1230 μ L. Se hizo un blanco general y un blanco de muestra. La actividad SOD se determinó midiendo durante 2 min la reducción del ferricitocromo a ferrocitocromo *c* a 550 nm y se expresó en unidades por miligramo de proteína total (U/mg). Se define 1 U de SOD como la cantidad de enzima necesaria para producir un 50% de inhibición de la reducción del ferricitocromo a 25°C (McCord y Fridovich, 1969).

La identificación de las isoenzimas SOD se realizó por el método del azul de nitrotetrazolio (NBT) usando los inhibidores KCN y H_2O_2 (Beauchamp y Fridovich, 1971; Bridges y Salin, 1981). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles nativos de 0,75 mm de espesor y acrilamida 15% para la fase separadora y 4% para la concentradora (**Tabla 12**) utilizando el sistema Mini-Protean III (Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo durante 2 h y 30 min, a 200 V y 4°C. El tampón usado fue Tris-HCl 25 mM (pH 8,3) con glicina 192 mM.

Tras la electroforesis, los geles se preincubaron a temperatura ambiente durante 1 h en: (a) tampón KP 50 mM (pH 7,8), como control; (b) KP con KCN 3 mM para inhibir las actividades CuZnSOD; (c) KP con H_2O_2 5 mM para inhibir las actividades CuZnSODs y FeSOD. A continuación, los geles se incubaron en NBT 0,48 mM en KP 50 mM (pH 7,8) a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min. Los geles se incubaron a continuación en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 min con tampón KP

50 mM (pH 7,8), riboflavina 30 μM y TEMED 0,2%. Finalmente el gel, se lavó con tampón y se expuso a la luz para el revelado. La determinación de la abundancia relativa de las distintas isoenzimas se llevó a cabo mediante densitometría con el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EEUU).

Tabla 12. Composición de los geles concentrador y separador en condiciones no desnaturalizantes.

Reactivo	Gel concentrador ^a	Gel separador ^a
Acrilamida/bis-acrilamida (40% T, 3% C) ^b	103 μL	1,35 mL
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	-	888 μL
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	250 μL	-
H ₂ O	648 μL	1,31 mL
Persulfato de amonio 10%	8 μL	35,5 μL
TEMED	0,8 μL	3,55 μL

^a Se indican los volúmenes necesarios para la preparación de un gel. Se utilizaron 3,5 mL del gel separador y 1 mL del gel concentrador.

^b $T = [\text{g acrilamida} + \text{g bis-acrilamida}] / \text{volumen total} \times 100$. $C = [\text{g bis-acrilamida} / (\text{g acrilamida} + \text{g bis-acrilamida})] \times 100$.

3.8.2. Catalasa

La actividad catalasa se determinó siguiendo la descomposición del H₂O₂ a 240 nm durante 1 min, utilizando un coeficiente de extinción (ϵ)=39,4 M⁻¹cm⁻¹ (Aebi, 1984). La enzima se extrajo a partir de hojas (50 mg) o raíces (250 mg) con 250 μL de KP 50 mM (pH 7) y PVP-10 0,5%. Los extractos se centrifugaron y la actividad se midió en el sobrenadante. En la reacción se utilizó 60 μL de H₂O₂ 10 mM, extracto (15 μL hojas ó 75 μL raíces) y KP 50 mM (pH 7) hasta completar un volumen final de 1 mL. El blanco se hizo con este mismo medio de reacción sin añadir extracto.

3.8.3. Enzimas del ciclo ascorbato-glutati6n

La actividad **ascorbato peroxidasa total (APX total)** se extrajo a partir de hojas (50 mg) o raíces (100 mg) con 100 μL de medio de extracci6n que contenía KP 50 mM (pH 7), PVP-10 0,5% y ascorbato 0,5 mM, el cual se a6adi6 en el momento de la extracci6n para impedir la inactivaci6n de las APXs de los org6nulos. Los extractos se centrifugaron y la actividad se determin6 en el sobrenadante siguiendo la oxidaci6n de ascorbato a 290 durante 2 min, utilizando $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Asada, 1984). Para las hojas, se observ6 una

fase de latencia en los primeros 30 s de la reacción. El medio de reacción contenía 25 μL de ascorbato 20 mM, extracto de hojas (20 μL) o raíces (50 μL), 60 μL de H_2O_2 10 mM y KP 50 mM (pH 7) hasta completar un volumen final de 1 mL. Se hizo un blanco que no contenía extracto y un blanco para cada muestra omitiendo el H_2O_2 . Este último blanco permitió corregir la oxidación del ascorbato por la ascorbato oxidasa (AO).

La actividad **monodeshidroascorbato reductasa (MR)** se determinó siguiendo el descenso del NADH durante 90 s utilizando $\epsilon=6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 340 nm (Dalton y cols, 1993). Se homogeneizó 50 mg de material vegetal (hojas o raíces) en 100 μL de KP 50 mM (pH 7,8), PVP-10 1%, EDTA 0,2 mM, Triton X-100 0,1% y β -mercaptoetanol 0,1 mM. El medio de reacción contenía por 150 μL de NADH 0,667 mM, 125 μL de ascorbato 5 mM, 50 μL de AO (0,01 U/mL; Sigma) para la generación del MDHA, extracto de hojas (30 μL) o raíces (25 μL) y Tricina 50 mM (pH 7,8) hasta completar un volumen de 1 mL. Se hicieron como controles un blanco general al que no se le añadió extracto, y un blanco para cada muestra, que contenía extracto pero no AO, para corregir la oxidación del NADH independiente de la actividad MR.

La actividad **deshidroascorbato reductasa (DR)** se determinó siguiendo la producción de ascorbato a 265 nm durante 3 min utilizando $\epsilon= 1,41 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nakano y Asada, 1981). La extracción se realizó en las mismas condiciones que las usadas para ensayar la actividad MR. El medio de reacción contenía 100 μL de EDTA 1 mM, 100 μL de DHA 2 mM en KP 100 mM (pH 7) saturado de nitrógeno, 100 μL de GSH 25 mM, 20 μL de extracto (hojas o raíces) y KP 100 mM (pH 7) hasta un volumen de 1 mL. Como controles se hicieron un blanco general que no contenía extracto y un blanco para cada muestra sin GSH para corregir la reducción de ascorbato independiente de GSH.

La actividad **glutación reductasa (GR)** se determinó siguiendo el descenso de absorbancia del NADPH a 340 nm durante 3 min utilizando $\epsilon=6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Dalton y cols, 1986). Se homogeneizaron hojas (40 mg) o raíces (60 mg) con 200 μL de KP 50 mM (pH 7,8), PVP-10 1%, EDTA 0,2 mM y Tritón X-100 0,1%. El medio de reacción contenía 100 μL de NADPH 1,25 mM, 100 μL de EDTA 5 mM, 100 μL de GSSG 2,5 mM, extracto de hojas (75 μL) o raíces (75 μL), y Tricita 50 mM (pH 7,8) hasta completar 1 mL de volumen. Se hizo un blanco general al que no se le añadió extracto y un blanco para cada muestra que no contenía extracto ni GSSG para corregir la oxidación del NADPH independiente de la actividad GR.

3.8.4. Ascorbato oxidasa

La actividad AO se determinó siguiendo durante 3 min el descenso de absorbancia a 265 nm debido a la oxidación del ascorbato, utilizando $\epsilon=14,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Pignocchi y cols, 2003). Los extractos se hicieron a partir de 10 mg de material vegetal (hojas o raíces) en 100 μL de tampón fosfato de sodio (NaP) 10 mM (pH 6,5) y se centrifugaron (13000g x15 min, 4°C). Debido a la localización apoplástica de la AO se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en un medio que contenía NaP 10 mM (pH 6,5), NaCl 1 M. La suspensión se mantuvo durante 10 min a 4°C agitando vigorosamente cada 2 min. A continuación, las muestras se centrifugaron y se utilizó el sobrenadante para el ensayo. El medio de reacción contenía 750 μL de NaP 10 mM (pH 5,6), 100 μL de EDTA 5 mM, 100 μL de ascorbato 1 mM y 50 μL de extracto (hojas o raíces). Se hizo un blanco general sin extracto y un blanco para cada muestra en el que no se añadió ascorbato.

3.9. Glutación y homoglutación sintetasas

Las actividades GSHS y hGSHS se determinaron mediante la cuantificación del GSH y hGSH producidos (Hell y Bergmann, 1988; Kocsy y cols, 1996). Se homogeneizaron 100 mg de hojas o raíces con 500 μL de medio de extracción [Tris-HCl 50 mM (pH 8), EDTA 0,2 mM, glicerol 10% y MgCl_2 10 mM]. Tras centrifugar (13000g x 20 min, 4°C) los extractos, se tomaron 250 μL de sobrenadante y se diluyeron en 1 mL del medio de extracción. El extracto se concentró con membranas de 10 kDa (Centricon C-10, Millipore), centrifugando a 3500g hasta alcanzar un volumen final de 250 μL . El volumen final de la reacción fue de 200 μL . La mezcla de reacción contenía: 40 μL de medio de reacción [Tris-HCl 100 mM (pH 8,5), KCl 50 mM, MgCl_2 20 mM], 10 μL de ATP 100 mM, 10 μL de fosfoenolpiruvato 100 mM, 10 μL de piruvato kinasa (100 U/mL), 10 μL de ditioeritritol (DTE) 50 mM, 10 μL de γ -glutamilcisteína 10 mM y 10 μL de glicina 100 mM (actividad GSHS) o β -alanina (actividad hGSHS). Para iniciar el ensayo, se añadió 100 μL de muestra a la mezcla de reacción (preincubada durante 3 min a 30°C). A tiempo cero y después de haber incubado la mezcla de ensayo 1 h a 30°C, se tomaron 80 μL y se derivatizaron en oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente con 300 μL de ácido *N*-[2-hidroxi-etil]piperacina-*N'*-3-propanosulfónico 200 mM (pH 8), ácido

dietilentriaminopentaacético 5 mM y 120 mL de monobromobimano 7 mM. La reacción se paró añadiendo 97 μL de ácido acético 40% y las muestras se almacenaron a -80°C .

El análisis de HPLC se realizó en una columna C_{18} de 3,9 x 150 mm y 4 μm (Nova-Pak, Waters) con un flujo de 1 mL/min. Para ello, las muestras derivatizadas se descongelaron, se pasaron por filtros Ultrafree-MC 0,45 μm (Millipore) y se inyectaron (10 μL) en el HPLC. La fase móvil fue metanol 15% con ácido acético 0,25% (pH 3,5). La detección se hizo por fluorescencia con un detector 474 (Waters) con excitación a 380 nm y emisión a 480 nm. La concentración exacta de los estándares de GSH y hGSH se determinó con ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) con $\epsilon=13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 412 nm (Ellman, 1959).

3.10. Ascorbato reducido y oxidado

El contenido de ascorbato total se determinó siguiendo la oxidación del ascorbato por la AO a 265 nm hasta que la reacción se estabilizó (c. 500 s). Se utilizó $\epsilon = 14,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 265 nm (Bartoli y cols, 2000). Debido a la progresiva oxidación del ascorbato, los ensayos se realizaron durante la primera semana tras la cosecha del material vegetal. Las extracciones se hicieron a partir de hojas (20 mg) o raíces (40 mg) con 100 μL de HClO_4 1 M. Los extractos se mantuvieron en hielo y oscuridad durante todo el ensayo para evitar la oxidación del ascorbato. El sobrenadante (13000g x 20 min, 4°C) se neutralizó con K_2CO_3 1 M para obtener un pH 7-7,5, óptimo para la actividad AO. Se utilizaron 87 μL de K_2CO_3 1 M por cada 200 μL de extracto. Seguidamente, se centrifugó de nuevo para eliminar el precipitado de KClO_4 . Para determinar el contenido de ascorbato total (ascorbato+DHA), se incubaron 125 μL de extracto con 6,5 μL de DTE 8 mM durante 15 min, en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras la incubación con DTE se midió la variación de absorbancia en un medio de reacción que contenía 50 μL del extracto derivatizado, 20 μL de AO (0,01 U/ μL) y ácido *N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-2-etanosulfónico (HEPES) 100 mM (pH 5,6) hasta completar 1 mL.

Para determinar el contenido de ascorbato reducido se utilizaron 50 μL de extracto sin derivatizar y 20 μL de AO (0,01 U/ μL), y se completó el volumen hasta 1 mL con HEPES 100 mM (pH 5,6). Como controles, además de un blanco general al que no se añadió extracto, se hizo un blanco para cada muestra, que no contenía AO, para

determinar la oxidación espontánea del ascorbato. El contenido de DHA se determinó calculando la diferencia del ascorbato total y el ascorbato reducido.

3.11. Glutación reducido y oxidado

El contenido de glutatión total (GSH + GSSG) y su estado redox se determinó siguiendo la variación de absorbancia a 412 nm durante 3 min del GSH formado a partir del GSSG por la actividad GR, mediante la derivatización del tiol con 5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzoico (Griffith, 1980). Las hojas (10 mg) o raíces (20 mg) se homogeneizaron con 100 μ L de ácido sulfosalicílico 5%, los extractos se centrifugaron y el sobrenadante se utilizó para el ensayo. Para cuantificar la cantidad de GSH+GSSG se utilizó un medio de reacción que contenía: 25 μ L extracto (hojas o raíces), 20 μ L de GR (50 U/mL), 100 μ L de 5,5'-ditiobis(ácido) 2-nitrobenzoico 6 mM, el volumen necesario de NADPH para tener una concentración final de 0,21 mM en el medio y KP 150 mM (pH 7,4) con EDTA 6,3 mM hasta completar el volumen final de reacción (1 mL). Se hizo un blanco general como control, que llevaba 25 μ L de tampón de extracción en lugar de muestra. La concentración de GSH se calculó por diferencia entre el glutatión total y GSSG en las muestras. Para determinar la concentración de GSSG, se derivatizaron 90 μ L de muestra con 6 μ L de vinylpiridina y 10 μ L de trietanolamina 98% (v/v) para bloquear los grupos tiol. Se agitó durante 30 s y se incubó a temperatura ambiente durante 25 min. Los calibrados para determinar las concentraciones de GSH+GSSG y GSSG se realizaron con GSH y GSSG en rangos de 0-4 nmol y 0-1 nmol, respectivamente.

3.12. Glutación y homoglutación total

Los tioles se extrajeron a partir de 50 mg de hojas o raíces con 500 μ L de ácido metanosulfónico 200 mM y DTE 0,5 mM. Los extractos se centrifugaron (13000g x 15 min, 4°C), se tomaron 200 μ L de sobrenadante y se mezclaron con 92 μ L de DTE 8 mM, 400 μ L de ácido *N*-[2-hidroxiethyl]piperacina-*N'*-3-propanosulfónico (EPPS) 200 mM (pH 8), ácido dietilen triamino pentaacético (DTPA) 5 mM y 8 μ L de NaOH 5 M. Esta mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente para asegurar la completa reducción de los grupos tiol. A continuación, se añadieron 200 μ L de monobromobimano (MBB) 7 mM (Fahey y Newton, 1987) y la mezcla resultante se incubó 15 min en oscuridad, ya que el MBB es fotosensible. Para detener la reacción de derivatización, se

añadieron 350 μL de ácido acético 20% (v/v). Tras la derivatización, las muestras se almacenaron a -80°C .

Para el análisis, las muestras derivatizadas se descongelaron, se centrifugaron 5 min y se pasaron por filtros Ultrafree-MC de 0,45 μm (Millipore). Se inyectaron 10 μL en el HPLC, donde los aductos de los tioles con el MBB se separaron en una columna C-18 (3,9 x 150 mm, 4 μm ; Waters). La composición de la fase móvil fue metanol 15% y ácido acético 0,25% (pH 3,5). Se usó un flujo de 1 mL/min y la detección se realizó por fluorescencia (detector 474, Waters) con excitación a 380 nm y emisión a 480 (Klapheck, 1988).

Los tiempos de retención y las áreas de los picos se determinaron con el programa Millennium³² (Waters). La titulación de los estándares fue la misma que la utilizada para la determinación de las actividades GSHS y hGSHS (apartado 3.9).

3.13. Localización de transcritos en nódulos

3.13.1. Preparación del tejido

Fijación y deshidratación de los nódulos

Los nódulos se fijaron en paraformaldehído 4% (p/v) disuelto en solución estabilizadora de microtúbulos [ácido piperazina-1,4-bis(2-etanosulfónico) 50 mM, ácido etilenglicol-bis-(2 aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético 5 mM, MgSO_4 5 mM; el pH se ajustó a 7,0 con KOH], Tritón X-100 0,1% y Tween-20 0,1%. Los nódulos se incubaron a 4°C durante toda la noche con agitación suave por balanceo. Para la deshidratación, se hizo un primer lavado con NaCl 0,85% (solución salina) durante 30 min y dos lavados con etanol 50% y 70%, respectivamente, en solución salina, durante 3 h cada uno. En un siguiente lavado, los nódulos se incubaron en etanol 85% en solución salina durante toda la noche. Posteriormente, se lavó con etanol 95% en agua destilada durante 4 h y se hicieron dos incubaciones con etanol absoluto, una durante 4 h y otra durante toda la noche.

Inclusión de los nódulos

Debido a que la deshidratación provoca la decoloración del tejido, antes de incluir los nódulos fue necesario teñirlos. La tinción se hizo a temperatura ambiente con agitación suave. Tras un lavado con etanol absoluto durante 2 h, los nódulos se incubaron 1 h con la solución colorante: 500 μL etanol absoluto; 500 μL HistoClear II (National Diagnostics,

Atlanta, EEUU); y 0,8 μL de eosina Y (Sigma) 2% (p/v). Seguidamente, se hicieron 3 lavados de 1 h cada uno con HistoClear II. A continuación, se comenzó la inclusión en parafina, que se realizó siempre en estufa a 60°C. Para ello, los nódulos se pasaron a viales de vidrio que contenían una mezcla HistoClear II: Paraplast X-tra (Fluka) en una proporción 1:1 y se incubaron toda la noche. Posteriormente, se reemplazó el HistoClear II por Paraplast X-tra progresivamente haciendo cambios cada hora durante 1 día. Para completar la inclusión en la parafina, durante los tres días siguientes se cambió el Paraplast X-tra dos o tres veces al día. Finalmente, entre 5-6 nódulos se colocaron en moldes desechables Peel-A-Way (Ted Pella, California, EEUU) que contenían Paraplast X-tra, se dejó que la parafina solidificara a temperatura ambiente y los bloques se guardaron a 4°C hasta su utilización.

Sección de los nódulos fijados

El bloque de parafina se sacó del molde y se hicieron secciones de 10 μm utilizando un microtomo Leica RH 2155 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Los cortes se depositaron sobre una gota de agua colocada en un portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific) de 25 x 75 mm y 1 mm de grosor. La cara brillante de cada sección fue la que quedó en contacto con el portaobjetos. Los portas se colocaron en estufa a 42°C y se dejaron toda la noche para que el agua se evaporara y las secciones se adhiriesen al portaobjetos.

3.13.2. Preparación de las sondas

Obtención de las sondas

Las sondas para la localización de los transcritos de las Hbs se obtuvieron a partir de oligonucleótidos específicos (**Tabla 13**) diseñados con el programa Primer Express (Applied Biosystems), teniendo en cuenta las secuencias TC24940 (*LjGLB1-1*), AB238221 (*LjGLB1-2*), TC22194 (*LjGLB2*) y GO024600 (*LjGLB3-2*). Para *LjGLB2* y *LjGLB3-2* se obtuvieron fragmentos internos de 300 pb, mientras que la homología existente entre las secuencias codificantes de *LjGLB1-1* y *LjGLB1-2* sólo permitió obtener fragmentos internos de 90 y 80 pb, respectivamente. La mezcla de reacción contenía: 2,5 μL de PCR buffer 10x, 1,25 μL de dNTPs 5 mM (Invitrogen), 1 μL Taq polimerasa (Biotools, Madrid), 1 μL de cDNA de nódulos de *L. japonicus*, y 3 μL de una mezcla 5 μM de los oligonucleótidos sentido y antisentido. El protocolo de la reacción de

PCR consistió en una etapa de desnaturalización de 30 s a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificación (15 s x 94°C, 30 s x 58°C, 1 min x 72°C) y una etapa de elongación final de 10 min a 72°C.

Tabla 13. Oligonucleótidos (5'→ 3') empleados para la hibridación *in situ*.

Gen	Sentido	Antisentido
<i>LjGLB1-1</i>	TCTTCCAGCTCATGCACTTCC	ACTAGCGCTTTGTGAACAGGG
<i>LjGLB1-2</i>	CAACCCTTTGCTCTCAGTTTCA	ACAGCCCCAAAGCAACAATAA
<i>LjGLB2</i>	AAGCACCTGAGGCAAAGGC	CCCCAAGCATTGCTCACTTC
<i>LjGLB3-2</i>	CAAAGCCTGCAGCATAAAGCT	GAAATGGTCGATGTGCGCCC
<i>pUC/M13</i>	GTAAAACGACGGCCAG	CAGGAAACAGCTATGAC

Se comprobó en cada caso que el producto de amplificación correspondía a una sola banda del tamaño esperado mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1,2% usando el sistema Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad) a 100 V durante 30 min. El tampón de electroforesis fue tampón TAE (Tris 0,5%, ácido acético 0,1%, EDTA 50 mM; pH 8,5). El producto de amplificación se mezcló con el tampón de carga [azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno-cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)] en una proporción muestra:tampón 5:1. Como marcador de peso molecular se usó “DNA Molecular Weight Marker XIV (100-1500 pb)” (Roche). A continuación, cada amplicón obtenido de la reacción PCR se clonó directamente en pGEM-T Easy (Promega). El plásmido recombinante se introdujo en células competentes de *E. coli* DH5α obtenidas por el método de RbCl (Sambrook y cols, 1989). La transformación de las células competentes se hizo mediante choque térmico. Para ello se añadió 4 µL de la mezcla de ligación a 200 µL de células competentes y se dejaron en hielo durante 30 min. Seguidamente, se incubaron en un baño a 42°C durante 45 s e inmediatamente se pusieron nuevamente en hielo. Se añadieron 800 µL de medio SOC [triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM] y la mezcla se incubó a 37°C durante 1,5 h a 200 rpm. A continuación, se sembró en placas con el medio de selección (apartado 3.2.2.). Dos clones positivos de cada construcción, aislados en placa de selección, se incubaron en medio LB líquido. El plásmido recombinante se purificó mediante el kit “High Pure Plasmid Isolation” (Roche) y se secuenció completamente para confirmar su identidad.

Marcaje de las sondas

Dentro del plásmido pGEM y flanqueando la zona de inserción de la secuencia de interés, hay sitios de unión al oligonucleótido (sentido y antisentido) del gen *pUC/M13*. Se amplificó por PCR convencional las construcciones usando el oligonucleótido sentido y antisentido de *pUC/M13* (Tabla 13; Invitrogen) para obtener un fragmento lineal de la construcción de interés. Las condiciones de PCR fueron: una etapa de desnaturalización de 3 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificación (30 s x 94°C, 30 s x 60°C, 1 min x 72°C) y una etapa de elongación final de 10 min a 72°C. Para la reacción se partió de una concentración de 400 ng/μL de DNA y se añadieron 10 μL de PCR Buffer 10X (Eurobio, Les Ulis Cedex, Francia), 2 μL de MgCl₂ 50 mM, 2 μL de dNTPs 10 mM, 1 μL de Eurobotaq DNA Polimerasa (50 U/μL; Biotin, Londres, Reino Unido), 4 μL de una mezcla equimolar de los oligonucleótidos sentido y antisentido *pUC/M13* 10 μM (Invitrogen). La mezcla se completó con agua desionizada estéril hasta un volumen final de 100 μL. Tras comprobar mediante electroforesis en geles de agarosa que se obtenía una sola banda del tamaño esperado, la sonda se purificó a partir del producto de PCR con el kit comercial “PCR Clean Up Gel Extraction: NucleoSpin Extract II” (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Una vez purificada la sonda, se marcó con digoxigenina unida a UTP usando “DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)” (Roche). Para la reacción de marcaje se emplearon 13 μL de sonda y se obtuvo la correspondiente sonda marcada antisentido (sonda positiva) y sentido (sonda negativa).

3.13.3. Hibridación *in situ*

El proceso de hibridación *in situ* se realizó usando un sistema automatizado “InsituPro VS” (Intavis Bioanalytical Instrument AG, Colonia, Alemania).

Pretratamiento del tejido

Todos los pasos para el pretratamiento del tejido se realizaron a temperatura ambiente. En primer lugar, para eliminar la parafina de las secciones de nódulos, se hicieron dos incubaciones con HistoClear II de 10 min. Para eliminar los restos de HistoClear II, los portas se pasaron por etanol absoluto y seguidamente se realizó la hidratación del tejido mediante lavados de 5 min con etanol (90, 80, 60, 50 y 30%) en solución salina y un lavado final de 10 min en solución salina. A continuación, para favorecer la accesibilidad de la sonda marcada al mRNA, se realizó una incubación de 5 min en Tris-HCl 50 mM

(pH 7,5) con EDTA 5 mM, seguida de una digestión con Pronasa (Roche) 0,13 mg/mL durante 10 min. La reacción de hidrólisis se paró mediante dos incubaciones de 2 min cada una con tampón fosfato alcalino (PBS): NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄ 3 mM. Para preservar mejor la integridad del tejido, se hizo un tratamiento de “postfijación” que consistió en dos incubaciones con paraformaldehído 4% en PBS de 15 min cada una. Seguidamente, se hicieron tres lavados de 2 min cada uno con tampón PBS y se realizó una incubación de 10 min con anhídrido acético (trietanolamina 1,25%, HCl 0,5%, ácido acético anhidro 5%) que favorece la acetilación de los grupos amino y bloquea los grupos cargados que pudieran reaccionar con la ribosonda y aumentar el ruido de fondo. Se hicieron nuevamente dos lavados de 2 min con PBS seguidos de un lavado con solución salina durante 2 min. Finalmente, el tejido volvió a deshidratarse mediante lavados de 2 min con etanol (30, 50, 80, 95%) en solución salina y etanol absoluto.

Hibridación

En esta fase, todas las reacciones se realizaron a una temperatura de 50°C y todos los reactivos se prepararon utilizando agua desionizada autoclavada. Los portaobjetos con las secciones de nódulos se lavaron durante 10 min con una solución que contenía NaCl 300 mM, Tris-HCl 100 mM, Na₂HPO₄ 100 mM y EDTA 5 mM. Posteriormente, cada porta se preincubó durante 30 min con 250 µL de la solución de prehibridación [31,25 µL de 1:10 de solución de lavado, 125 µL formamida; 31,25 µL de sulfato de dextrano 50%; 6,25 µL 50X Denhardt's (Invitrogen); y agua desionizada autoclavada hasta completar el volumen final de reacción]. A continuación, se realizó la hibridación con la sonda durante 14 h. La mezcla de hibridación contenía: 5 µL de la sonda marcada, 30,6 µL de solución de lavado, 122,5 µL de formamida, 61,25 µL de sulfato de dextrano 50%, 3,1 µL de tRNA 100 mg/mL, 6,1 µL de 50X Denhardt's y agua desionizada autoclavada hasta un volumen final de 250 µL.

Lavado

Para eliminar la solución de hibridación se lavó tres veces (30, 60 y 60 min respectivamente) a 50°C con una solución compuesta por 50% formamida y solución salina citrato (NaCl 300 mM, citrato sódico 30 mM). Después, se lavó tres veces con tampón NTE (NaCl 500 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) durante 5 min a 37°C, se llevó a cabo una digestión con RNasa A 20 µg/mL en tampón NTE, y a continuación, se

hicieron nuevamente dos lavados de 5 min cada uno con el tampón. Se incubó durante 1 h a 50°C con 50% formamida y solución salina citrato. Finalmente, se hizo un lavado de 5 min a temperatura ambiente solamente con solución salina citrato.

Incubación con el anticuerpo

Todos los pasos de la incubación se realizaron a temperatura ambiente. En primer lugar, se hicieron tres lavados de 5 min cada uno con tampón TBS [Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 500 mM] y se incubó durante 1 h con el “Blocking reagent” (Roche) 0,5% en TBS. A continuación, se hizo un lavado de 30 min con el tampón del anticuerpo (seroalbúmina bovina 1% y Triton X-100 0,3% en TBS) y se incubó durante 2 h con 0,5 µL/mL del anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina “Anti-Digoxigenin-AP fab fragments” (Roche). Posteriormente, se hicieron cuatro lavados de 10 min con TBS y se incubó durante 20 min con un tampón compuesto por Tris-HCl 100 mM (pH 9,8) y NaCl 100 mM.

3.13.4. Revelado y microscopía

La señal se visualizó incubando cada porta con 800 µL de solución de revelado [777 µL tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 9,8) con NaCl 100 mM; 19 µL de MgCl₂ 2 M; 1 µL de NBT (100 mg/mL en *N,N*-dimetilformamida 70%); 3 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (50 mg/mL en *N,N*-dimetilformamida 100%)] durante 2,5 h a temperatura ambiente. A continuación se paró la reacción en agua y las secciones se tiñeron con azul Alcian (Fluka) para la contracoloración. Para ello, previamente, se realizaron incubaciones de 2 min cada una en etanol 40%, etanol 70%, etanol absoluto, etanol 70%, etanol 40% y agua destilada. A continuación, se pasaron los portas por el colorante y seguidamente se lavaron tres veces con agua destilada. Las secciones se dejaron secar protegiéndolas de la luz y una vez secas, se añadieron 150 µL de solución neutra de poliestireno y plastificantes en xileno (DPX; Fluka) y se montaron los cubreobjetos. Las secciones se observaron con un microscopio invertido Leica DMI6000 B provisto de una cámara Leica DFC 350 FX.

3.14. Estudio de promotores de los genes *LjGLB*

3.14.1. Fusión promotor-gen informador

Para localizar las actividades de los promotores *LjGLB2*, *LjGLB3-1* y *LjGLB3-2*, se amplificaron 1430, 1761 ó 1955 pb de la secuencia de DNA aguas arriba del ATG de inicio, respectivamente, usando PCR y los correspondientes clones genómicos como moldes (**Tabla 14**). A los oligonucleótidos se les añadió secuencias de reconocimiento (indicadas en letra minúscula) para las enzimas de restricción *PstI* y *NcoI* (en el oligonucleótido sentido-antisentido, respectivamente): *LjGLB2* (5'-ctgcagTCGAAAA TCATATTATTGCGC-3'; 5'-ccatggTGTTCTTTTTGTTTCCTT-3'); *LjGLB3-1* (5'-ctgc AGGTTAAGTCAAGTGGTAAG-3'; 5'-ccatggCTTTGAAGTTTGTTC-3'), y *LjGLB3-2* (5'-ctgcagTCGTGATGCACAAACCTTC-3'; 5'-ccatggCTCAAACGACACAGCCTTTG-3'). Los productos amplificados se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega) y el plásmido recombinante se introdujo, mediante choque térmico, en células competentes de *E. coli* DH5 α . Se verificó por secuenciación que no se había introducido ningún cambio en dos clones positivos para cada construcción. Debido a que la secuencia de 1955 pb del clon *LjGLB3-1* contiene un sitio de restricción interno *PstI*, se subclonó la secuencia de DNA de 1386 pb por encima del codón de inicio. El fragmento *PstI* y *NcoI* de cada promotor fue subclonado en los mismos sitios del vector binario pGFPGUS+ (Vickers y cols, 2007) para obtener la construcción pGUS-GLB. El plásmido resultante carecía de la secuencia 35S-GFP y contenía el promotor *LjGLB* en lugar del promotor 35S dirigiendo la expresión de GUS. A continuación, se transformaron células competentes de *A. rhizogenes* LBA1334 con la correspondiente construcción pGUS-GLB. Para ello se añadió 5 μ L de la mezcla de ligación a 50 μ L de células competentes de *A. rhizogenes* LBA1334 y se dejaron en hielo durante 15 min. Los tubos se sumergieron en nitrógeno líquido y se incubaron a 37°C durante 5 min. Posteriormente, se añadió 1 mL de medio YEB (extracto de carne 5g/L; extracto de levadura 1g/L; peptona 5g/L; sacarosa 5 g/L; MgSO $_4$ 0,48 g/L), se incubó a 200 rpm durante 2-4 h a 28°C y se centrifugó a temperatura ambiente (3000g x 3 min). Finalmente, se eliminó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 200 μ L de YEB y se sembró en placas con el medio de selección (apartado 3.2.2.).

3.14.2. Transformación de plantas

Se transformaron raíces de *L. japonicus* cv. Gifu para obtener plantas compuestas (raíz transgénica y parte aérea silvestre) con la cepa de *A. rhizogenes* LBA1334 transformada con el vector pGUS-GLB2, pGUS-GLB3-1 ó pGUS-GLB3-2. Cinco días después de la germinación, las plantas fueron inoculadas 2-3 cm por debajo de los cotiledones con *A. rhizogenes*, para ello, se seccionaron los hipocotilos a la altura del lugar de inoculación y las raíces se eliminaron. Después, los hipocotilos se transfirieron a placas Petri que contenían medio Jensen (**Tabla 14**) suplementado con NH_4NO_3 1,5 mM y se incubaron, en posición vertical, en cámara de crecimiento a 20°C con 16/8 h de luz/oscuridad. Para evitar que la raíz penetrase en el agar, se puso sobre la superficie papel de filtro previamente autoclavado, y para mantener la humedad dentro de las placas, éstas se sellaron con Parafilm (Ted Pella, Redding, EEUU).

Tabla 14. Composición del medio Jensen (Díaz y cols, 2005).

Nutriente	g/L
CaHPO_4	1
K_2HPO_4	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
NaCl	0,2
$\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1
Agar	0,9
Solución de elementos traza*	12,5 mL

*Solución de elementos traza: 35,4 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 462 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 97,4 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,27 g/L H_3BO_3 ; 398 mg/L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Tres días después de la transformación, las semillas se transfirieron a placas con el medio de emergencia (HRE) basado en el medio SH [2,5 g/L de KNO_3 ; 0,4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g/L de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 0,2 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 10 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 5 mg/L de H_3BO_3 ; 1 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/L de KI; 0,2 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/L de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 15 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 20 mg/L de NaEDTA; (Schenk y Hildebrandt, 1971)] al que se le añadió: 0,1 g/L de mioinositol; 5 mg/L de ácido nicotínico; 10 mg/L de piridoxina-HCl (vitamina B6); 10 mg/L de tiamina HCl; 2 mg/L de glicina; 10 g/L de sacarosa; 3 mL de ácido 2-[N-morfolino]etano-

sulfónico 1 M; 3 mL/L de una solución 100 mg/mL de cefotaxima (Duchefa Biochemie, Haarlem, Holanda); se ajustó el pH hasta 5,8 usando una solución de KOH 10 M; y, se añadió agar 0,9%. Las plantas se dejaron crecer durante 10 d (20°C con 16/8 h de luz/oscuridad) para permitir la emergencia de la raíz transformada (Díaz y cols, 2005) y, a continuación, se transfirieron a maceta y se nodularon con *M. loti* R7A (apartados 3.2.1. y 3.2.2.).

3.14.3. Tinción β -glucuronidasa

Treinta y dos días después de inocular las plantas con *M. loti* R7A, los nódulos de las raíces transgénicas se tiñeron con la solución β -glucuronidasa (GUS), que contenía: Na₂HPO₄·H₂O 100 mM, EDTA 10 mM, ferricianuro potásico 1 mM y Tritón X-100 0,1% (Jefferson y cols, 1987). Se ajustó el pH a 7,0 con NaOH y se añadió 1 mg/L de 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -glucurónico (X-Gluc) en *N,N*-dimetilformamida. Tras 20 min de infiltración al vacío, las muestras se incubaron a 37° C en oscuridad durante 48 h. Después de varios lavados con agua desionizada, los nódulos se embebieron en agar 5% y se hicieron secciones de 80 μ m usando un vibratomo (Leica VT1000 S). Las secciones se observaron con estereomicroscopio invertido (Leica módulos DM IL LED y M165 FC).

Los nódulos de las raíces transformadas con *A. rhizogenes* LBA1334 que no llevaban el vector pGUS-GLB se usaron como controles negativos.

3.14. Análisis estadístico

En todos los casos se realizaron al menos cuatro réplicas de tres series distintas de plantas crecidas independientemente en idénticas condiciones. Los datos relativos a los parámetros fisiológicos y de crecimiento, contenido mineral, proteína, prolina, pigmentos fotosintéticos, actividades enzimáticas y contenido de metabolitos fueron analizados utilizando el programa SPSS v.14.0 (Chicago, EEUU). Para cada grupo de medidas se calculó la media y error estándar. Las medias de los tratamientos se compararon con el correspondiente control mediante el test *t* de Student para $P < 0,05$.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Antioxidantes de *Lotus japonicus* en condiciones de estrés salino

4.1.1. Estado fisiológico de la planta y daño oxidativo

Para el estudio del efecto de la salinidad sobre *L. japonicus* se utilizaron plantas en estado vegetativo, crecidas en maceta. Un grupo de plantas se mantuvo en condiciones óptimas de crecimiento y sirvió como control. Se aplicaron dos tipos de estrés salino: un tratamiento con NaCl 150 mM durante 7 d (S1) y un tratamiento progresivo con NaCl 50, 100 y 150 mM durante un total de 18 d (S2).

En la primera parte del trabajo se caracterizó el estado fisiológico de las plantas control y tratadas (S1 y S2). El crecimiento se determinó midiendo el PS de la parte aérea y la superficie foliar total (**Fig. 8a**). El PS aumentó en las plantas S1 y disminuyó ligeramente (c. 16%) en las plantas S2, pero el área foliar por planta descendió significativamente en ambos tratamientos de salinidad, siendo más acusado (37%) en plantas S2. Para estudiar la toxicidad iónica asociada al estrés salino se determinó el contenido de distintos elementos en las hojas. El contenido en Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ no varió en las plantas S1, mientras que el Na⁺ se acumuló 2,6 veces, el Ca²⁺ aumentó un 27% y el K⁺ descendió el 28% en las plantas S2 (**Fig. 8a**). Además, no se detectaron cambios significativos en otros elementos (Mg, P, S, Fe, Cu y Mn), excepto un 34% de incremento en el contenido de Zn con ambos tratamientos. Debido al estrés osmótico asociado a la salinidad, durante el estrés salino la planta necesita reducir su Ψ_w para hacerlo inferior al

del suelo y favorecer la absorción de agua por la raíz. Los Ψ_w de las hojas (media \pm SE) de las plantas S1 ($-1,26 \pm 0,04$ MPa) y S2 ($-1,38 \pm 0,04$ MPa) fueron ligeramente inferiores al de las plantas control ($-0,81 \pm 0,03$ MPa), lo que indica que ambos tratamientos de salinidad (S1 y S2) causaron un ligero estrés hídrico.

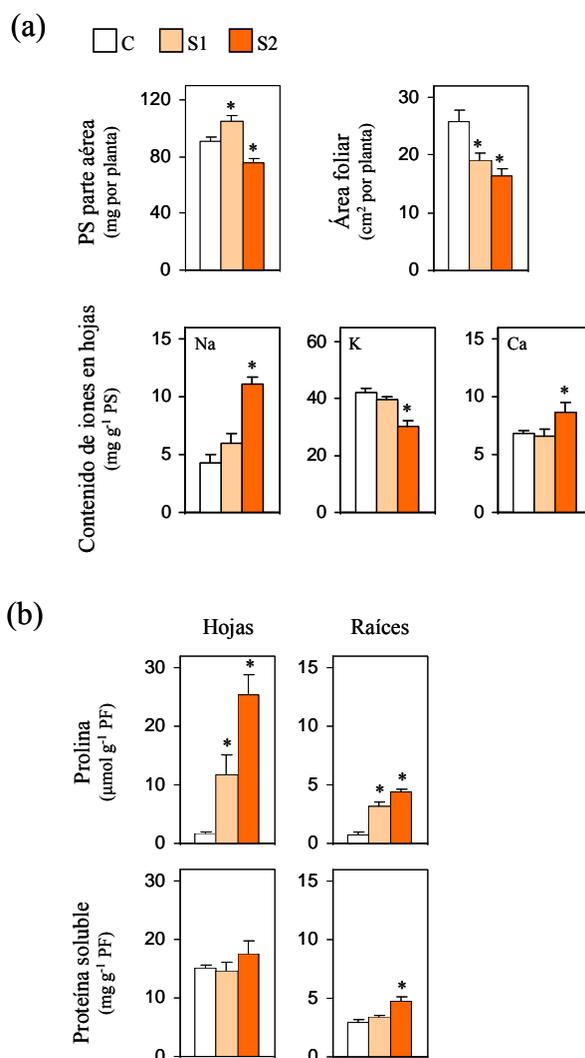


Figura 8. Efecto del estrés salino sobre algunos parámetros fisiológicos y bioquímicos de *L. japonicus*. C, plantas no tratadas y cosechadas a los 33 d de edad; S1, plantas tratadas a los 26 d de edad con NaCl 150 mM durante 7 d; S2, plantas tratadas a los 15 d de edad con NaCl 50, 100 y 150 mM, aplicando cada concentración de NaCl durante 6 d. (a) Peso seco (PS) de la parte aérea de la planta, área foliar y contenido de iones en hojas. (b) Contenido en prolina y proteína total soluble en hojas y raíces. Los valores corresponden a las medias \pm ES de 50-90 réplicas para el PS, 8-13 para el área foliar y el contenido de iones, ó 3-9 para prolina y proteína soluble de al menos tres series de plantas que crecieron independientemente. Los asteriscos indican las diferencias significativas con los valores obtenidos para las plantas control según un test *t* de Student ($P < 0,05$). PF, peso fresco.

Se determinaron varios marcadores de estrés como indicadores del estado fisiológico de la planta: prolina, proteína soluble, pigmentos fotosintéticos y productos metabólicos derivados del daño oxidativo. La prolina es un metabolito osmoprotector usado como marcador de estrés hídrico (Bates y cols, 1973) y salino (Díaz y cols, 2005). El contenido de prolina se incrementó 6 y 14 veces en hojas y 4 y 6 veces en raíces de las plantas S1 y S2, respectivamente (**Fig. 8b**). Por el contrario, el contenido de proteína soluble no varió en hojas durante ninguno de los tratamientos y aumentó un 59% en raíces de plantas S2 (**Fig. 8b**). La concentración de clorofila *a*, *b* y carotenoides se mantuvo constante en plantas S1 y S2. Por último, se estimaron la oxidación de proteínas (grupos carbonilos totales) y la peroxidación de lípidos (malondialdehído) como marcadores de estrés oxidativo en hojas y raíces. No se detectó aumento en los niveles de proteínas oxidadas en hojas o raíces de las plantas S1 ó S2. El contenido de malondialdehído no varió en las plantas S1, pero se incrementó 2 y 1,7 veces en raíces y hojas, respectivamente, en las plantas S2 (**Fig. 9**).

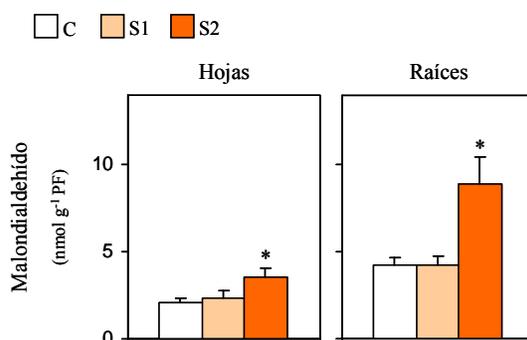


Figura 9. Efecto del estrés salino sobre el contenido de malondialdehído de hojas y raíces de *L. japonicus*. Los tratamientos son los mismos que los indicados en la Figura 8. Los valores son medias \pm ES de 5-10 réplicas de al menos cuatro series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican las diferencias significativas respecto a las plantas control según el test *t* de Student ($P < 0,05$).

4.1.2. Expresión de enzimas antioxidantes

El primer grupo de enzimas antioxidantes estudiado fue el de las SODs, metaloenzimas que catalizan la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a O_2 y H_2O_2 . Hay tres tipos de SODs en plantas según el cofactor metálico del sitio activo y su localización subcelular. En hojas y raíces de *L. japonicus* se han encontrado CuZnSOD citosólica (CuZnSODc), CuZnSOD plastidial (CuZnSODp), FeSOD citosólica (FeSODc), FeSOD plastidial (FeSODp) y MnSOD mitocondrial. Los niveles de transcritos permanecieron constantes para todas las

isoformas de SODs en las raíces de las plantas S1 y S2. Por el contrario, hubo un incremento del mRNA para todos los genes *SOD* en hojas de las plantas S1, con la excepción de *FeSODc*, cuya expresión no varió en las plantas S1 pero disminuyó en plantas S2 (**Fig. 10a**).

La abundancia relativa de las proteínas SOD durante ambos tipos de estrés salino se estimó mediante análisis *western blot* usando anticuerpos policlonales producidos en conejo con las proteínas purificadas CuZnSODp, MnSOD y FeSODc. Aunque el anticuerpo contra la FeSODc reconoce la isoforma plastidial (Rubio y cols, 2007), no se pudo diferenciar entre ambas isoformas por análisis *western blot*, por lo que se cuantificaron juntas. En hojas, los niveles de proteína CuZnSODp aumentaron en las plantas S2, mientras que la proteína FeSOD (FeSODc + FeSODp) disminuyó en ambos tratamientos de salinidad (**Fig. 10b**). En raíces, se produjo también un incremento de los niveles de la proteína MnSOD en las plantas S1 y S2 (**Fig. 10b**), mientras que no se apreciaron cambios significativos en los de CuZnSODp o FeSOD.

Las actividades SOD total (media \pm ES; 6-13 réplicas) en hojas y raíces de las plantas control fueron $11,02 \pm 0,34$ y $26,36 \pm 1,08$ U/mg proteína, respectivamente, y permanecieron constantes en ambos tratamientos de salinidad. La composición en isoformas SOD en hojas y raíces se determinó en geles nativos. En raíces, la actividad SOD (entre paréntesis se muestra el porcentaje respecto a la actividad SOD total) correspondía mayoritariamente a la MnSOD (48%) y la CuZnSODc (43%), mientras que la CuZnSODp (6%) y la FeSOD (3%) eran mucho menos abundantes. Por el contrario, en hojas se observó una gran actividad MnSODp (62%) y actividades mucho menores de las CuZnSODp (25%), CuZnSODc (10%) y FeSOD (2%) (**Fig. 10c**). Al igual que ocurrió con el contenido en proteína, las actividades FeSODc y FeSODp no pudieron diferenciarse mediante geles nativos. La actividad CuZnSODc permaneció constante en las hojas de las plantas S1 pero aumentó un 80% en las plantas S2 (**Fig. 10c**). Sin embargo, la actividad específica para las otras isoformas de SOD no varió en hojas o raíces de las plantas S1 o S2.

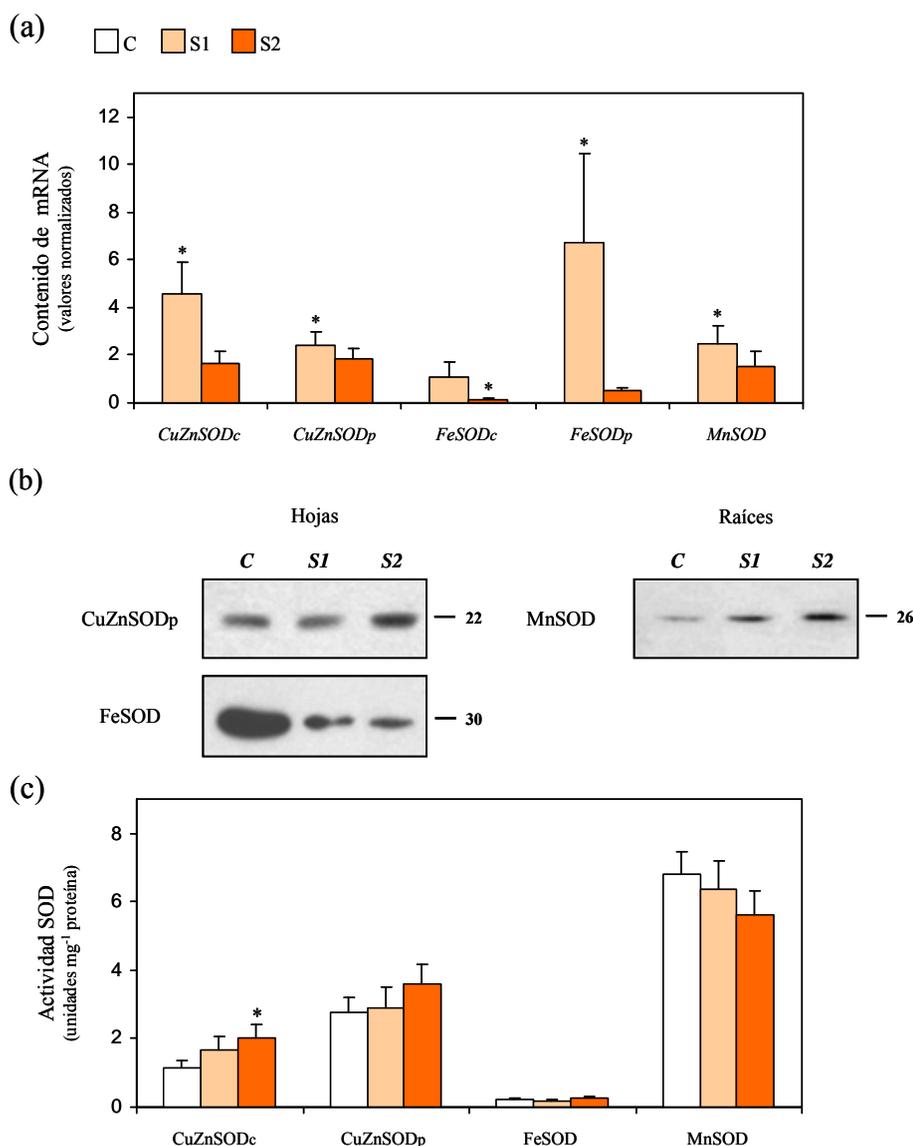


Figura 10. Efecto del estrés salino sobre la expresión de las isoformas SOD. Los tratamientos son los mismos que los indicados en la Figura 8. **(a)** Abundancia relativa de mRNA en hojas de *L. japonicus*, cuantificado mediante qRT-PCR. Los valores de mRNA se normalizaron frente al gen *ubiquitina* y se relativizaron frente al de plantas control, a las que se les asignó arbitrariamente el valor de 1. Los datos son medias \pm ES de 5-6 réplicas biológicas de al menos dos series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican la inducción ($\geq 2,0$ veces) o represión ($< 0,5$ veces) de los genes respecto a los valores control. **(b)** Análisis *western blot* de las SOD en hojas y raíces de plantas de *L. japonicus* expuestas a estrés salino. **(c)** Actividad específica de las isoformas SOD. Los datos son medias \pm ES de 5-13 réplicas de al menos cinco series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican las diferencias significativas respecto a las plantas control según el test *t* de Student ($P < 0,05$).

La expresión de las enzimas clave para la eliminación del H_2O_2 se estudió también en condiciones de estrés salino. La catalasa es una enzima peroxisomal que descompone el H_2O_2 a H_2O y O_2 , mientras que las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión, localizadas en el

citosol, cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, reducen el H_2O_2 a H_2O utilizando ascorbato y GSH. Los niveles de expresión de estas enzimas se determinaron mediante qRT-PCR, lo que permitió diferenciar cuatro genes *APX*, dos *MR*, dos *DR* y dos *GR* (**Fig. 11**). En las hojas de las plantas S1, se indujo levemente la expresión de los genes que codifican la APX tilacoidal (APXt) y DRc y se reprimió el gen de la APX estromal (APXs). Por el contrario, en las hojas de las plantas S2, sólo los niveles de transcrito de DRc aumentaron. Sin embargo, en raíces, la expresión del gen de la catalasa se indujo en las plantas S1 y se reprimió en las plantas S2, mientras que la expresión de la GR citosólica (GRc) disminuyó en las plantas S1 y la expresión de la DRc se indujo en ambos tratamientos de salinidad (**Fig. 11**).

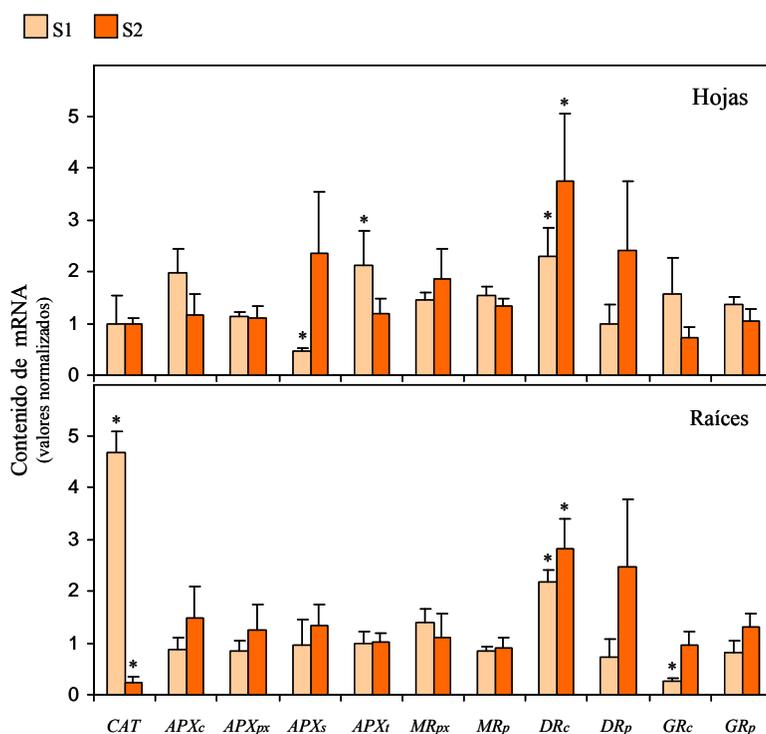


Figura 11. Efecto del estrés salino sobre los niveles de mRNA de catalasa (CAT) y enzimas del ciclo ascorbato-glutación en hojas y raíces de *L. japonicus*. Los tratamientos son los mismos que los indicados en la Figura 8. Los valores de mRNA se normalizaron frente al gen *ubiquitina* y se relativizaron frente al de plantas control, a las que se les asignó arbitrariamente el valor de 1. Los datos son medias \pm ES de 5-6 réplicas biológicas de al menos dos series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican la inducción ($> 2,0$ veces) o represión ($< 0,5$ veces) de los genes respecto a los valores control. *Subíndices*: c, citosólica; p, plastidial; px, peroxisomal; s, estromal; t, tilacoidal.

Los niveles relativos de proteína catalasa y de algunas de las enzimas del ciclo ascorbato-glutación se determinaron en hojas y raíces. En ambos órganos, los anticuerpos

para catalasa y APX reconocían una sola banda de proteínas con una masa molecular aparente de *c.* 50 y 30 kDa, respectivamente, coincidiendo con la teórica según la secuencia de aminoácidos. Los niveles de proteínas catalasa y APX permanecieron constantes durante ambos tratamientos. Asimismo, según lo esperado a partir de las secuencias de aminoácidos de la DR de *A. thaliana* y *L. japonicus*, los anticuerpos frente a la DRc y DRp de *A. thaliana* reconocieron dos bandas de 28 y 30 kDa, respectivamente. Cada uno de estos anticuerpos presenta reactividad cruzada con la otra isoforma, aunque con una afinidad mucho menor. No se detectó DRp en los extractos de raíces y la DRc fue menos abundante en extractos de hojas que en raíces. En ambos tratamientos de salinidad, los niveles de proteína DRc aumentaron en hojas y raíces, mientras que la DRp permaneció constante en hojas (**Fig. 12**).

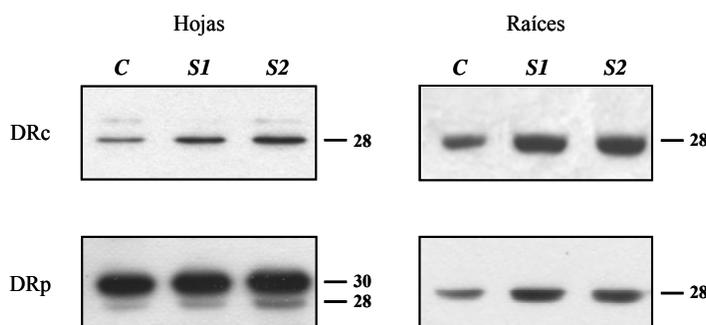


Figura 12. Análisis *western blot* de la DR en hojas y raíces de plantas de *L. japonicus* expuestas a estrés salino. Los tratamientos son los mismos que los indicados en la Figura 8. Los datos son medias \pm ES de 5-13 réplicas de al menos cinco series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican las diferencias significativas respecto a las plantas control según el test *t* de Student ($P < 0,05$).

Los tratamientos de salinidad no tuvieron efectos significativos en las actividades de las enzimas implicadas en la eliminación del H_2O_2 , a excepción de la DR. La actividad DR total (DRc + DRp) aumentó 1,4 y 2,2 veces en las hojas y raíces de las plantas S2, respectivamente (**Fig. 13**).

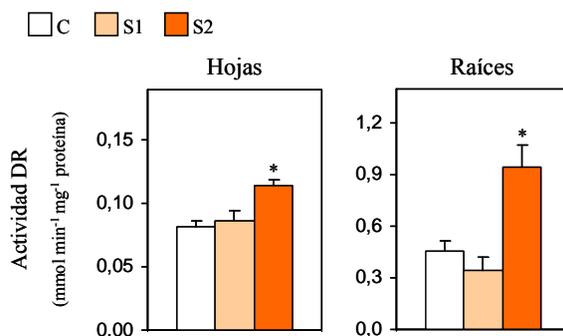


Figura 13. Efecto del estrés salino sobre la actividad DR en hojas y raíces de *L. japonicus*. Los tratamientos son los mismos que los indicados en la Figura 8. Los datos son medias \pm ES de 3-8 réplicas de al menos tres series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican las diferencias significativas respecto a las plantas control según el test *t* de Student ($P < 0,05$).

4.1.3. Ascorbato y glutatión

Las concentraciones de ascorbato total (ascorbato reducido + DHA) y glutatión total (GSH + GSSG) se determinaron en plantas expuestas a estrés salino. El contenido de ascorbato total en hojas y raíces fue de 3 y 0,5 $\mu\text{mol/g}$ PF, respectivamente, y no varió en respuesta a los tratamientos de salinidad. Asimismo, el estado redox del ascorbato (proporción de ascorbato reducido en relación al ascorbato total) se mantuvo en un rango de 91-94% en hojas y 78-79% en raíces. La concentración de glutatión total y su estado redox (proporción de GSH en relación al glutatión total) también permanecieron constantes en ambos tratamientos de salinidad. Así, el contenido de glutatión total en hojas y raíces fue de *c.* 1,0 y 0,3 $\mu\text{mol/g}$ PF, respectivamente, y el correspondiente estado redox fue 97-98% y 94-95%.

4.2. Tiol sintetasa de *Lotus japonicus*

4.2.1. Regulación de las tiol sintetasa en respuesta a óxido nítrico y hormonas

La respuesta de los genes de las tiol sintetasa al NO fue determinada en *L. japonicus* utilizando SNAP como donador de NO. La aplicación exógena de SNAP causó la activación de γECS y *GSHS*, pero no la de *hGSHS*. Esta inducción fue observada a las 3 y 24 h de la adición de SNAP al medio hidropónico (**Fig. 14**).

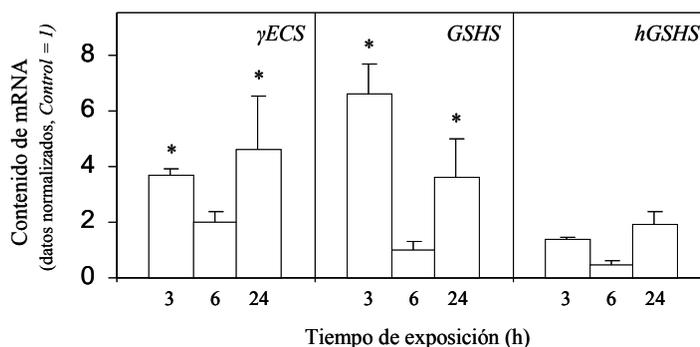


Figura 14. Efecto del NO sobre la expresión de los genes tiol sintetasa de *L. japonicus*. Los valores de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se relativizaron frente al de plantas control (no tratadas), a las que se les asignó arbitrariamente el valor de 1. Los datos son medias \pm ES de 3-4 réplicas biológicas de al menos dos series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican la inducción (>2,0 veces) de los genes respecto a los valores control.

Asimismo, la respuesta de estos genes a varias hormonas fue analizada tras 1-48 h después de añadirles al medio hidropónico a una concentración final de 50 μ M. En este caso, los niveles de expresión de los tres genes implicados en la síntesis de tioles fueron cuantificados en hojas y raíces de plantas de 45 d. En hojas, ninguno de los tratamientos con hormonas tuvo un efecto significativo sobre la expresión de las tiol sintetetas, probablemente debido a un transporte limitado de las hormonas a la parte aérea durante el tiempo de tratamiento, como tampoco tuvieron efecto el GA y ACC sobre la expresión de los genes en raíces (datos no mostrados). Sin embargo, las restantes hormonas estudiadas afectaron notablemente la expresión de los tres genes (**Fig. 15**). En raíces, el tratamiento con IAA disminuyó ligeramente el nivel de mRNA de γECS a las 3 h, mientras que provocó un incremento de 10 veces del mRNA de *GSHS* a las 24 h y de 2 veces del mRNA de *hGSHS* a las 48 h. Las CKs no tuvieron efecto en la expresión de γECS o *hGSHS*, pero causaron un aumento del mRNA de *GSHS* de 4 a 8 veces a las 2 y 24 h, respectivamente. La aplicación exógena de PAs indujo levemente la expresión de γECS , no tuvo efecto sobre la expresión de *hGSHS* y activó la transcripción de *GSHS* en raíces a las 24 y 48 h (**Fig. 15**).

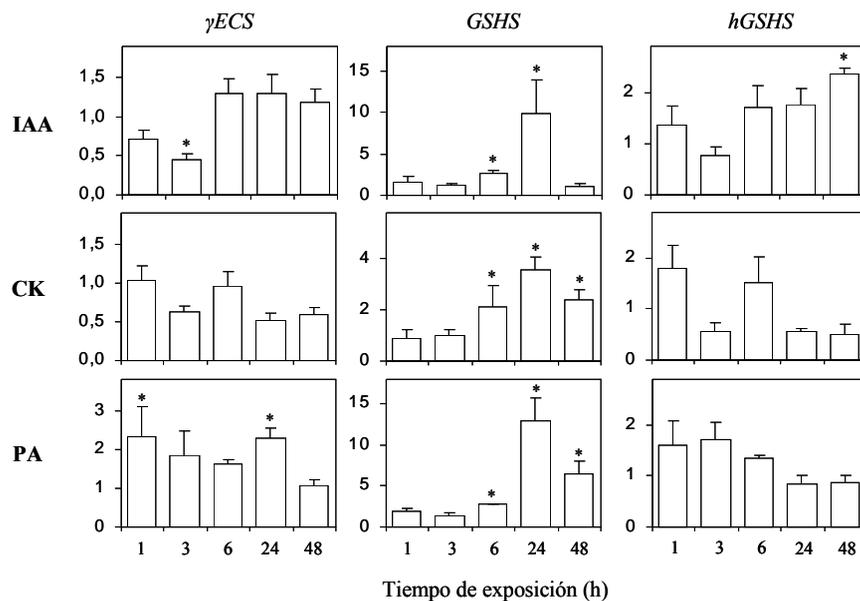


Figura 15. Efecto de varias hormonas sobre la expresión de los genes *tiol sintetasa* de *L. japonicus*. Los valores de mRNA se normalizaron frente al gen *ubiquitina* y se relativizaron frente al de plantas control, a las que se les asignó arbitrariamente el valor de 1. Los datos son medias \pm ES de 3-4 réplicas biológicas de al menos dos series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican la inducción (>2,0 veces) o represión (<0,5 veces) de los genes respecto a los valores control.

4.2.2. Efecto de las hormonas sobre el contenido y síntesis de tioles en raíces

La regulación de la expresión de las tiol sintetetas de *L. japonicus* se estudió también a nivel de actividad enzimática y contenido de metabolitos en muestras de raíces tras 48 h de tratamiento. En nuestro estudio nos fue imposible detectar actividad GSHS o GSH en raíces, lo cual coincide con nuestras observaciones de que el mRNA de *hGSHS* es *c.* 100 veces más abundante que el de *GSHS* y de que la raíz de *L. japonicus* produce casi exclusivamente hGSH. Por tanto, nuestro estudio de expresión de tiol sintetetas a nivel de actividad o metabolito se ha restringido a la actividad hGSHS y al contenido de hGSH.

La actividad hGSHS de las raíces no varió tras los tratamientos con CKs y PAs, mientras que se duplicó en respuesta a IAA (**Fig. 16a**). El contenido de hGSH en raíces aumentó con las CKs. En cambio, en raíces de plantas tratadas con PAs, el contenido de hGSH fue tres veces menor que en las raíces control (**Fig. 16b**).

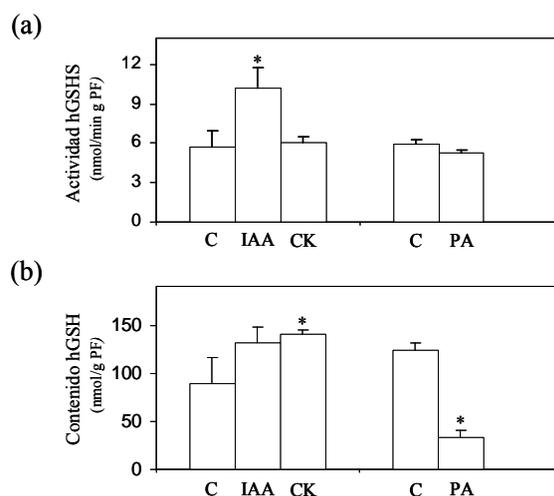


Figura 16. Efecto de varias hormonas sobre (a) la actividad hGSHS y (b) el contenido de hGSH en raíces de *L. japonicus*. Las plantas se trataron a los 45 d con 50 μ M de hormonas durante 48 h. Los datos son medias \pm ES de cuatro réplicas de al menos dos series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican las diferencias significativas respecto a las plantas control según el test *t* de Student ($P < 0,05$). C, control.

4.3. Hemoglobinas no simbióticas y truncadas de *Lotus japonicus*

4.3.1. Estructura de los genes *LjGLB*

El análisis de las genotecas y de las secuencias EST de *L. japonicus* nos permitió identificar los genes que codifican Hbs no simbióticas y truncadas. Estos cinco genes responden a la estructura génica convencional de las globinas y constan de cuatro exones interrumpidos por tres intrones (**Tabla 15**). Los genes *LjGLB1-1* y *LjGLB1-2* codifican proteínas de 161 aminoácidos, y los genes *LjGLB2*, *LjGLB3-1* y *LjGLB3-2* codifican proteínas de 152, 169 y 168 aminoácidos, respectivamente.

Tabla 15. Composición exon-intrón de los genes *hemoglobinas* de *L. japonicus* (*LjGLB*) y *A. thaliana* (*AtGLB*). E, exón; I, intrón; ORF, marco de lectura abireto. E, I, ORF se expresan en pares de bases; La longitud y el peso molecular (PM) de la proteína (prot) se indican en número de aminoácidos y kDa, respectivamente.

Gen	Clon genómico	E1	I1	E2	I2	E3	I3	E4	ORF	Prot	PM
<i>LjGLB1-1</i>	chr3.CM0091	113	127	115	203	117	196	141	486	161	18,0
<i>LjGLB1-2</i>	chr3.CM0091	116	91	115	910	117	593	138	486	161	18,1
<i>LjGLB2</i>	LjSGA_005472	98	98	115	1391	117	139	129	459	152	17,1
<i>LjGLB3-1</i>	LjT12F08	137	128	131	249	145	76	97	510	169	19,6
<i>LjGLB3-2</i>	LjT35N10	137	103	131	1641	145	89	94	507	168	19,5
<i>AtGLB1</i>	At2g16060	113	82	115	79	117	97	138	483	160	18,0
<i>AtGLB2</i>	At3g10520	104	82	115	593	117	98	141	477	158	17,9
<i>AtGLB3</i>	At4g32690	137	353	131	358	145	138	115	528	175	20,2

Mediante análisis BLAST se compararon las secuencias de Hbs de *L. japonicus* con las Lbs de esta especie y con las Hbs no simbióticas y truncadas de otras plantas superiores. Se elaboró un árbol filogenético utilizando el *software* ClustalX2 por el método *neighbor joining*. El número de Hbs no simbióticas varía entre especies. Por ejemplo, en *M. truncatula* y arroz se han encontrado cuatro y cinco genes, respectivamente, mientras que en *A. thaliana* se han descrito tres. Antes de nuestro estudio, el gen *LjGLB2* no se había identificado y por ello, en trabajos previos, el grupo de Uchiumi (Shimoda y cols, 2005) había denominado *LjGLB1* y *LjGLB2* a los genes que nosotros hemos designado aquí como *LjGLB1-1* y *LjGLB1-2* con el fin de evitar confusiones, ya que ambos genes codifican Hbs de clase 1.

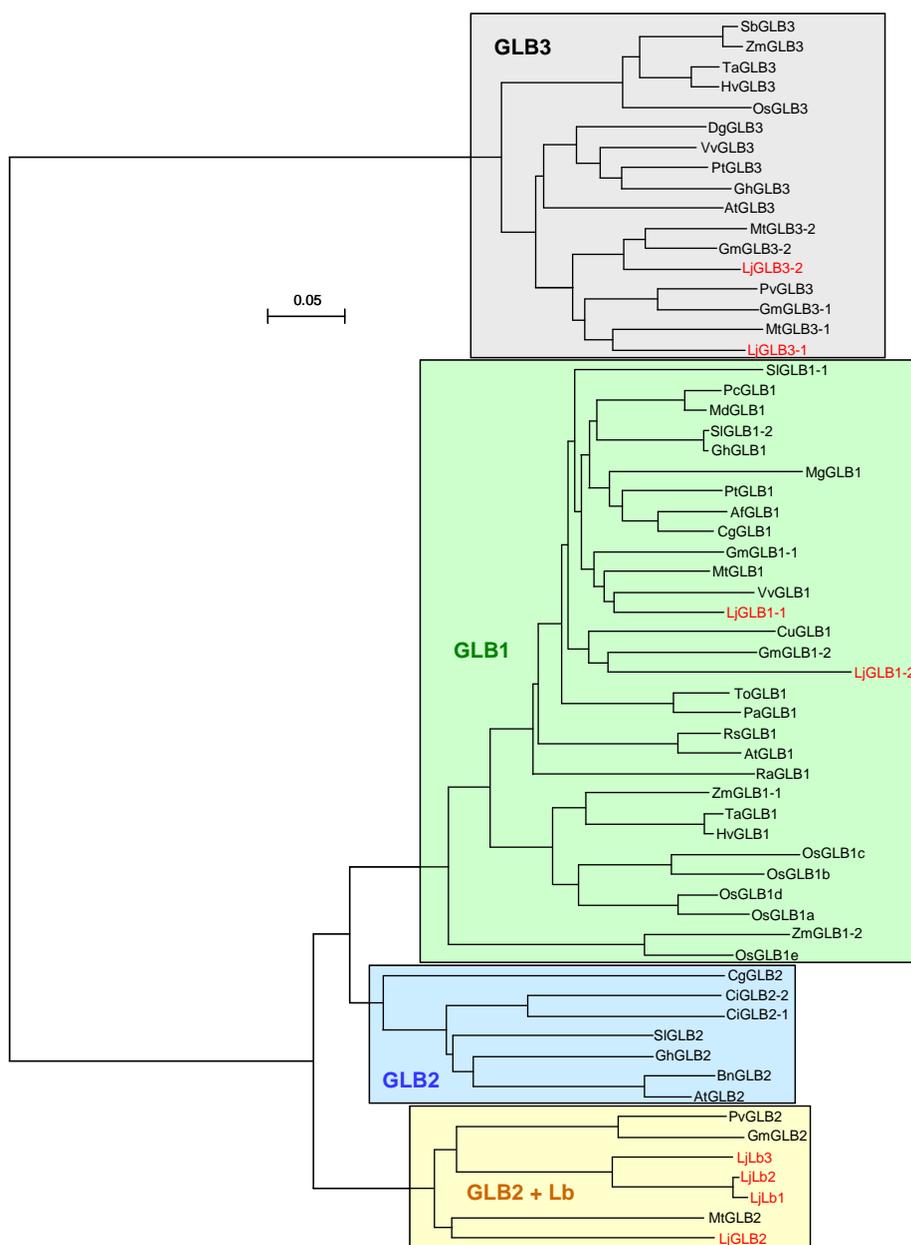


Figura 17. Análisis filogenético de las Hbs no simbióticas y truncadas de plantas vasculares, Hb simbiótica de *Casuarina glauca* (*Cg*; CAA37898, CAA54774) y Lbs de *L. japonicus* (*Lj*; TC74540, TC67341, TC68542, TC24940, TC36730, TC38673, TC39169, GO024600). *Alnus firma* (*Af*; BAE75956), *Arabidopsis thaliana* (*At*; At2g16060, At3g10520, At4g32690), *Brassica napus* (*Bn*; AAK07741), *Cichorium intybus* (*Ci*; CAB91629, CAA07547), *Citrus unshiu* (*Cu*; AAK07675), *Dactis glomerata* (*Dg*; CAD33536), *Glycine max* (*Gm*; ACU20737, ACU23998, BW657999, ACU16521, ACU15953), *Gossypium hirsutum* (*Gh*; CD485973, DW225765, DW498764), *Hordeum vulgare* (*Hv*; Q42831, AV938248), *Malus domestica* (*Md*; AAP57676), *Medicago truncatula* (*Mt*; BF647820, GT139723, BG581990, DW018457), *Myrica gale* (*Mg*; ABN49927), *Oryza sativa* (*Os*; Os06g0591600, Os03g0233900, Os03g0234000, Os03g0234100, Os03g0226200, Os05g0517600), *Parasponia andersoni* (*Pa*; AAB86653), *Phaseolus vulgaris* (*Pv*; CV538047, CV537343), *Populus tremula* (*Pt*; DT507484, BU813137), *Pyrus communis* (*Pc*; AAP57677), *Raphanus sativus* (*Rs*; AAP37043), *Rheum australe* (*Ra*; ACH63214), *Solanum lycopersicum* (*Sl*; AAK07676, AAX86687, AAK07677), *Sorghum bicolor* (*Sb*; CX611671), *Trema orientalis* (*To*; CAB16751), *Triticum aestivum* (*Ta*; AAN85432, CJ808530), *Vitis vitifera* (*Vv*; EV230272, EV233360), *Zea mays* (*Zm*; EE295293, CF625311, EE332098). La barra representa 0,1 sustituciones por sitio. El árbol se realizó por el método *neighbor joining* (Larkin y cols, 2007) del programa ClustalX2.

El árbol filogenético permite distinguir tres grandes grupos de Hbs (**Fig. 17**). Dos de ellos corresponden esencialmente a las Hbs truncadas y a las Hbs no simbióticas de clase 1. Un tercer grupo incluye a las Hbs no simbióticas de clase 2 y, en una rama separada del árbol se incluyen las Hbs no simbióticas de clase 2 de leguminosas y las Lbs de *L. japonicus*. Se puede observar que la GLB2 de *L. japonicus* está próxima a las Lbs, lo que hace pensar que éstas evolucionaron a partir de las Hbs no simbióticas de clase 2 (**Fig. 17**).

4.3.2. Expresión de los genes *LjGLB* en la planta

La expresión relativa de las Hbs no simbióticas y truncadas de *L. japonicus* se determinó en plantas crecidas en cultivo hidropónico. Las hojas, tallos, raíces y nódulos procedían de plantas de 45 d, mientras que las flores y frutos procedían de plantas de 60 d. Los frutos (vaina y semillas) se cosecharon cuando la vaina alcanzó una longitud de 3,5 cm. Los datos se normalizaron frente a la *ubiquitina* y se expresaron de forma relativa a los niveles de mRNA de las muestras de raíces, a las que se les asignó el valor de 1, usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

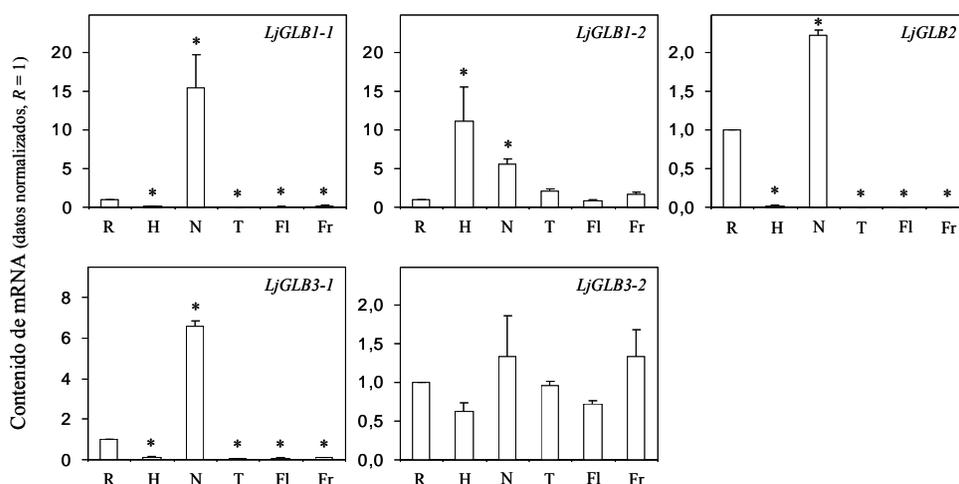


Figura 18. Abundancia relativa de mRNA de las Hbs no simbióticas y truncadas en distintos órganos de *L. japonicus*. Raíces (R), hojas (H), nódulos (N), tallos (T), flores (Fl) y frutos (Fr). Los valores de mRNA se normalizaron frente al gen *ubiquitina* y se relativizaron frente a los de raíces, a las que se le asignó arbitrariamente el valor de 1. Los datos son medias \pm ES de 4-6 réplicas biológicas de al menos tres series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican la inducción (> 2,0 veces) o represión (< 0,5 veces) de los genes respecto a los valores control.

El análisis qRT-PCR indica que los genes *LjGLB1-1*, *LjGLB2* y *LjGLB3-1* se expresan en raíces y de manera más abundante en nódulos, mientras que los mRNAs de *LjGLB1-2* y *LjGLB3-2* se detectaron en todos los órganos estudiados, siendo el mRNA de *LjGLB1-2* más abundante en hojas y nódulos (**Fig. 18**).

4.3.3. Localización de los transcritos y actividades de los promotores *LjGLB* en nódulos

La localización en los nódulos de los mRNAs que codifican las Hbs no simbióticas y truncadas se determinó por hibridación *in situ*, utilizando sondas de RNA marcadas con digoxigenina unida a UTP. La elevada homología entre las secuencias de los dos genes *LjGLB1* permitió diseñar sondas específicas de sólo 87 y 81 pb, respectivamente. Para la *LjGLB2* y *LjGLB3*, las sondas tenían un tamaño de 301 pb. La sonda *LjGLB3-2* se diseñó a partir de la única EST (LjGO024600) del gen *LjGLB3-2*. El análisis qRT-PCR indicó que la expresión relativa en nódulos de *LjGLB3-1* es 20 veces superior a *LjGLB3-2* (**Fig. 19**).

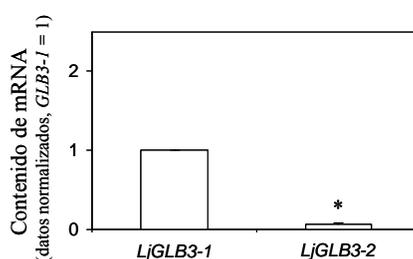


Figura 19. Proporción relativa de los niveles de mRNA del gen *GLB3-2* en relación a *GLB3-1* en nódulos de *L. japonicus*. Los valores de mRNA se normalizaron frente al gen *ubiquitina* y se relativizaron frente al obtenido para el gen *GLB3-1*, al que se le asignó arbitrariamente el valor de 1. Los datos son medias \pm ES de 4-5 réplicas biológicas de al menos tres series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican la inducción ($> 2,0$ veces) o represión ($< 0,5$ veces) de los genes respecto a los valores control.

Los mRNAs de *LjGLB1-1* y *LjGLB1-2* se localizaron en el córtex, la zona de fijación-infección y los haces vasculares, mientras que los de *LjGLB2* y *LjGLB3-2* se detectaron principalmente en el córtex y, en el caso de *LjGLB3-2*, también en los haces vasculares (**Fig. 20**).

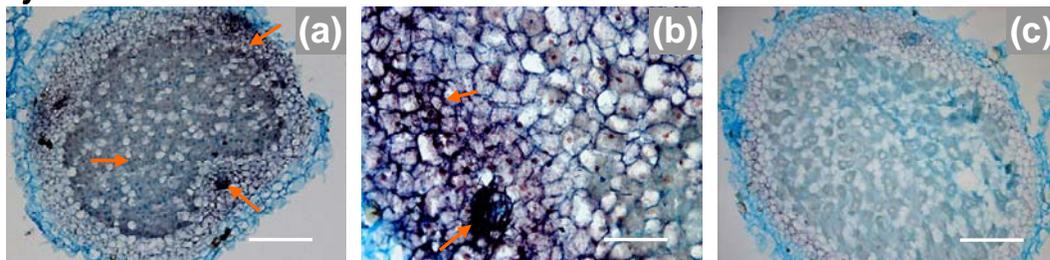
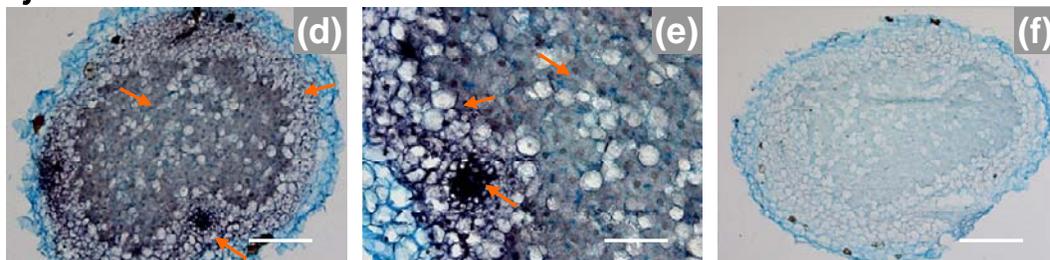
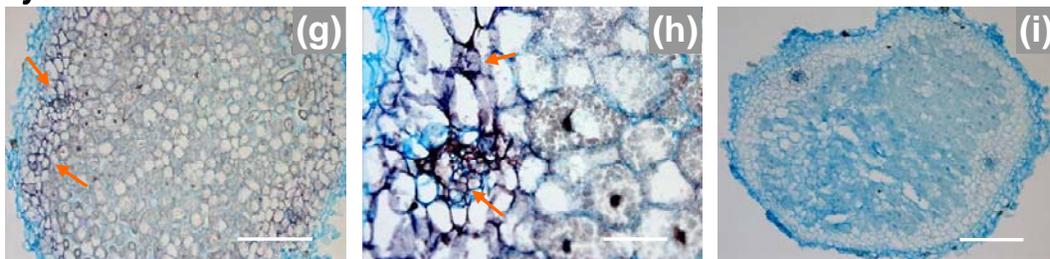
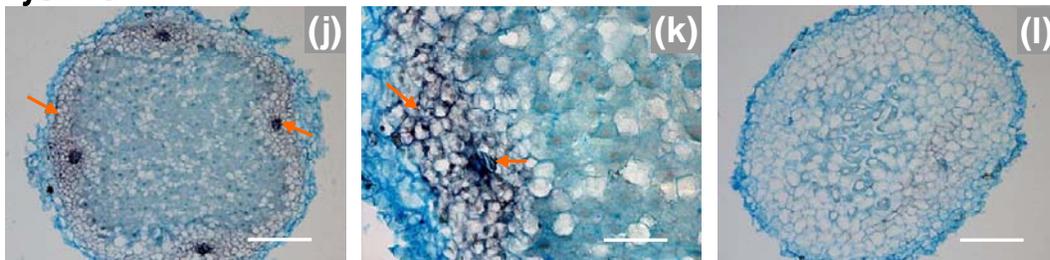
LjGLB1-1**LjGLB1-2****LjGLB2****LjGLB3-2**

Figura 20. Localización *in situ* de los mRNAs de los genes *LjGLB* en nódulos. En la primera columna (a, d, g, j) se muestran los resultados de la hibridación con la sonda antisentido; las imágenes de la segunda columna (b, e, h, k) son una ampliación de las de la primera columna; las imágenes de la tercera columna (c, f, i, l) corresponden a las hibridaciones con la sonda sentido (control). Barras: 75 μm (b, e, h, k); 300 μm (resto de las imágenes).

Para completar los resultados de hibridación *in situ* para los genes menos conocidos (*LjGLB2*, *LjGLB3-1*, y *LjGLB3-2*), se hicieron las construcciones de los correspondientes promotores con el gen informativo *GUS* y se analizó la expresión del mismo en raíces y nódulos (Figs. 21 y 22). El promotor *LjGLB2* es principalmente activo en los ápices y haces vasculares de la raíz (Fig. 21a) y en el córtex, zona de infección y haces vasculares

de nódulos jóvenes. A medida que el nódulo va madurando, la tinción GUS se pierde progresivamente en el córtex y en la zona de infección (**Fig. 21b-c**) y puede verse sólo en el tejido vascular de los nódulos maduros (**Fig. 21d**). Una localización similar se observó para los promotores de *LjGLB3-1* y *LjGLB3-2*, respectivamente. La tinción GUS para los promotores de estos dos genes, se observó en el ápice de la raíz (**Fig. 22a-e**), y en el tejido vascular de la raíz y los nódulos (**Fig. 22e-h**), y en el córtex del nódulo (**Fig. 22f-h**). En nódulos maduros, la tinción sólo fue visible en los haces vasculares y en la endodermis (**Fig. 22h**).

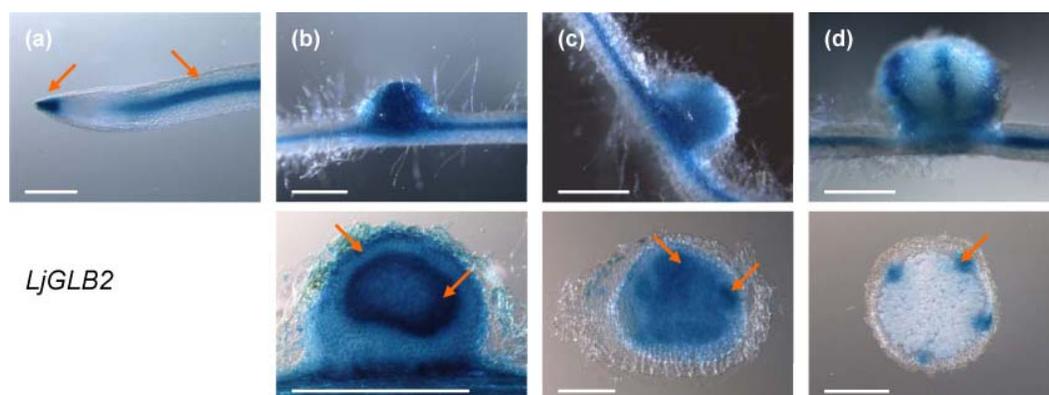


Figura 21. Actividad del promotor *LjGLB2* en raíces y nódulos. Las imágenes inferiores corresponden a secciones longitudinales o transversales de los nódulos de las imágenes superiores. La tinción GUS se observó, principalmente, en: (a) el ápice y los haces vasculares de raíces; (b-c) córtex, tejido vascular y zona de infección de los nódulos jóvenes; y (d) los haces vasculares de los nódulos maduros. Barra: 500 μ m

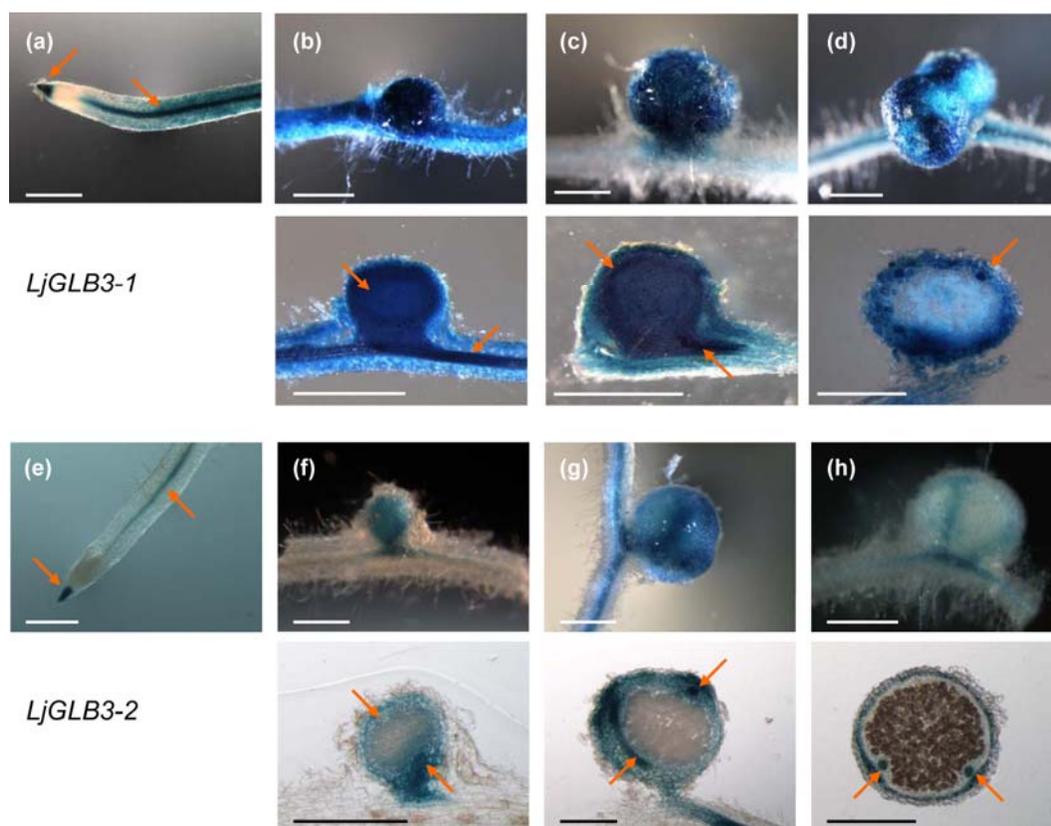


Figura 22. Actividad de los promotores *LjGLB3-1* y *LjGLB3-2* en raíces y nódulos. Las imágenes inferiores corresponden a secciones longitudinales o transversales de los nódulos de las imágenes superiores. La tinción GUS se observó, principalmente, en: (a-e) el ápice y los haces vasculares de raíces; (b-c) el córtex, tejido vascular y zona de infección; (f-g) el córtex, haces vasculares y la base de nódulos jóvenes; y (d-h) los haces vasculares y endodermis de los nódulos maduros. Barra: 500 μ m.

4.3.4. Expresión de los genes *LjGLB* en respuesta a óxido nítrico y estrés abiótico

El efecto del NO sobre la expresión de los genes *LjGLB* se analizó utilizando dos donadores de NO: SNP y SNAP. Las plantas de 45 d no noduladas, crecidas en cultivo hidropónico, se trataron con SNP 250 μ M durante 1 y 3 h. Este compuesto es fotosensible y en presencia de luz se descompone y libera NO y ferricianuro, que tiene efectos tóxicos sobre las células; por tanto, las plantas control se trataron con 0,5 mM de ferricianuro. Los resultados mostraron que, para tiempos superiores a 6 h, el efecto del ferricianuro sobre los genes es mayor que el producido por el tratamiento con SNP. Sin embargo, a 3 h no se detectó ningún efecto tóxico del ferricianuro y se observó la inducción de *LjGLB1-1* (**Fig. 23**). Los niveles de mRNA del resto de los genes estudiados se mantuvieron constantes. Este mismo resultado se obtuvo en plantas de 15 d que crecieron en placa Petri y que fueron tratadas durante 3, 6 y 24 h con SNAP (**Fig. 23**).

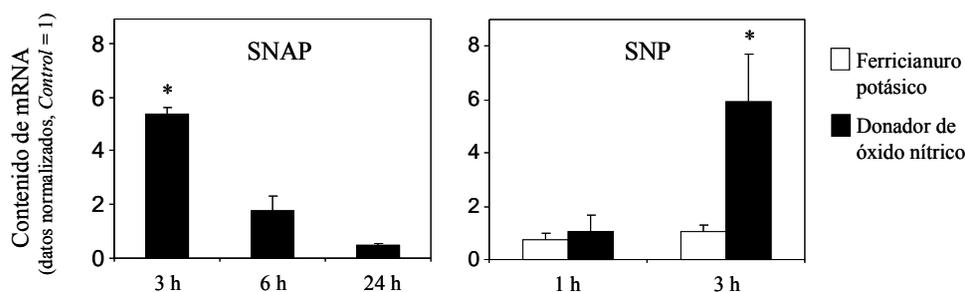


Figura 23. Efecto del NO sobre la expresión de *LjGLB1-1* en raíces. Las plantas fueron tratadas con SNP 0,25 mM ó SNAP 0,5 mM durante 1, 3 ó 24 h. Debido a que el SNP se descompone liberando NO y ferricianuro, se analizó simultáneamente la expresión de los genes en respuesta a 0,25 mM de este compuesto. Los valores de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se relativizaron frente a los de las plantas control, a los que se les asignó arbitrariamente el valor de 1. Los datos son medias \pm ES de 3-4 réplicas biológicas de al menos dos series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican la inducción ($>2,0$ veces) o represión ($<0,5$ veces) de los genes.

Las Hbs no simbióticas de plantas responden a distintos estreses (Dordas, 2009). Se ha descrito que los genes *LjGLB1-1* y *LjGLB1-2* se inducen en condiciones de anoxia y en respuesta al tratamiento con sacarosa, respectivamente (Sasakura y cols, 2006). Además, la expresión de *GLB2* de *A. thaliana* responde a bajas temperaturas (Trevaskis y cols, 1997). Para confirmar los resultados de los genes *LjGLB1* y completar los de los restantes genes *LjGLB*, hemos analizado la expresión de los cinco genes a hipoxia, sacarosa y frío en raíces de plántulas crecidas en placas de agar. Los tratamientos de 24 h se aplicaron en plántulas de 15 d crecidas en placas Petri en ausencia de luz. En el caso de estrés por bajas temperaturas, las plántulas se mantuvieron en oscuridad y se incubaron a 4°C. En el caso del estrés por hipoxia y el tratamiento con sacarosa, las plántulas se mantuvieron en oscuridad para evitar la producción de O₂ y de sacarosa, respectivamente, como resultado de la fotosíntesis.

El contenido de mRNA de *LjGLB1-1* aumentó en respuesta a hipoxia, sacarosa y bajas temperaturas, mientras que el resto de los genes no respondieron a ninguno de los tratamientos. Las excepciones fueron *LjGLB1-2*, cuya expresión aumentó ligeramente en respuesta a sacarosa, y *LjGLB3-1*, que mostró una expresión tres veces inferior a las plantas control en respuesta al tratamiento de frío (Fig. 24).

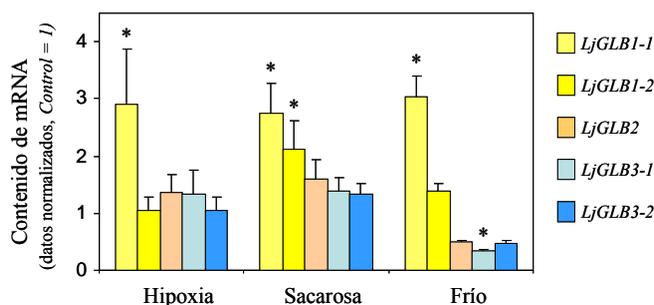


Figura 24. Efecto de distintos estreses abióticos en la expresión de las Hbs no simbióticas y truncadas de *L. japonicus*. Los valores de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se relativizaron frente a los de las plantas control, a los que se les asignó arbitrariamente un valor de 1. Los datos son medias \pm ES de 3-4 réplicas biológicas de al menos dos series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican inducción (>2,0 veces) o represión (<0,5 veces) de los genes.

4.3.5. Expresión de los genes *LjGLB* en respuesta a hormonas

La respuesta de los genes de las Hbs a hormonas fue investigada en plantas de *L. japonicus* crecidas en cultivo hidropónico. Para ello, se administró la misma concentración (50 μ M) de cada hormona en el medio líquido durante 48 h y se cuantificaron los mRNAs en raíces y nódulos.

En raíces, los resultados más interesantes fueron los siguientes: la expresión de *LjGLB1-1* aumentó *c.* 20 veces en respuesta a ACC, CKs y PAs, y *c.* 6 veces con los tratamientos de IAA y JA; el nivel de mRNA de *LjGLB1-2* se incrementó ligeramente en respuesta a ABA y disminuyó con el tratamiento de ACC y CKs. La expresión de *LjGLB2* se indujo 8-12 veces con GA, ABA y PAs, mientras que descendió con ACC y CKs. En el caso de *LjGLB3-1*, se indujo la transcripción en respuesta a ACC y PAs (4 y 7,5 veces, respectivamente), mientras que disminuyó la expresión con GA. El nivel de expresión de *LjGLB3-2* no varió en respuesta a hormonas excepto con el tratamiento de CKs, que provocó una disminución significativa (**Fig. 25**).

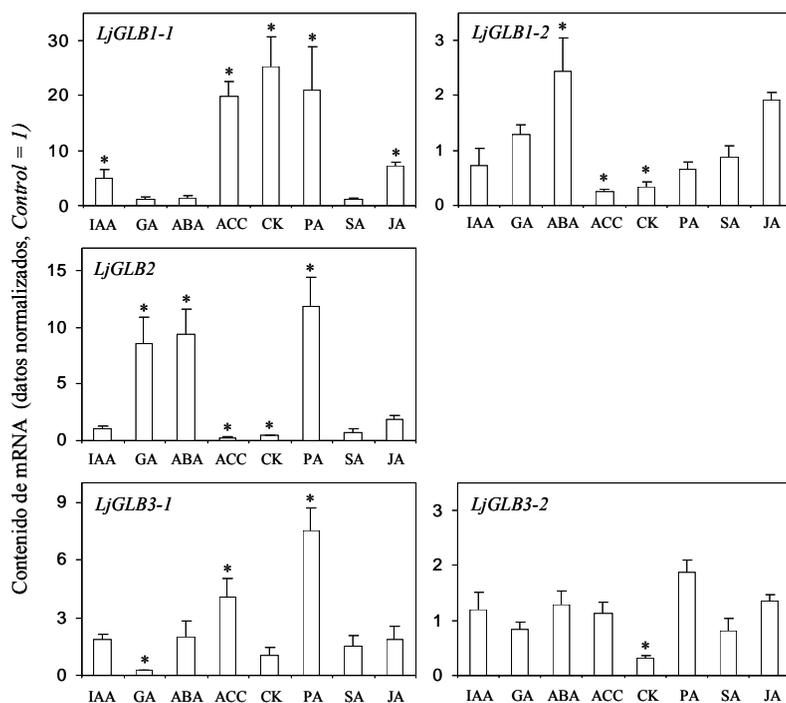


Figura 25. Efecto de las hormonas sobre la expresión de los genes *LjGLB* en raíces. Los valores de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se relativizaron frente a los de plantas control, a los que se les asignó arbitrariamente un valor de 1. Los datos son medias \pm ES de 4-6 réplicas biológicas de al menos tres series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican inducción ($> 2,0$ veces) o represión ($< 0,5$ veces) de los genes.

En los nódulos, los niveles de mRNA de *LjGLB1-2* y *LjGLB3-2* no resultaron afectados en ninguno de los tratamientos con hormonas, mientras que la expresión de *LjGLB1-1* aumentó 6 veces con ABA, 4,8 veces con ACC y sólo 2,3 veces con PAs. Por el contrario, las CKs inactivaron *LjGLB2* y *LjGLB3-1*. También se observó una disminución de la expresión de *LjGLB2* en el tratamiento con PAs (Fig. 26).

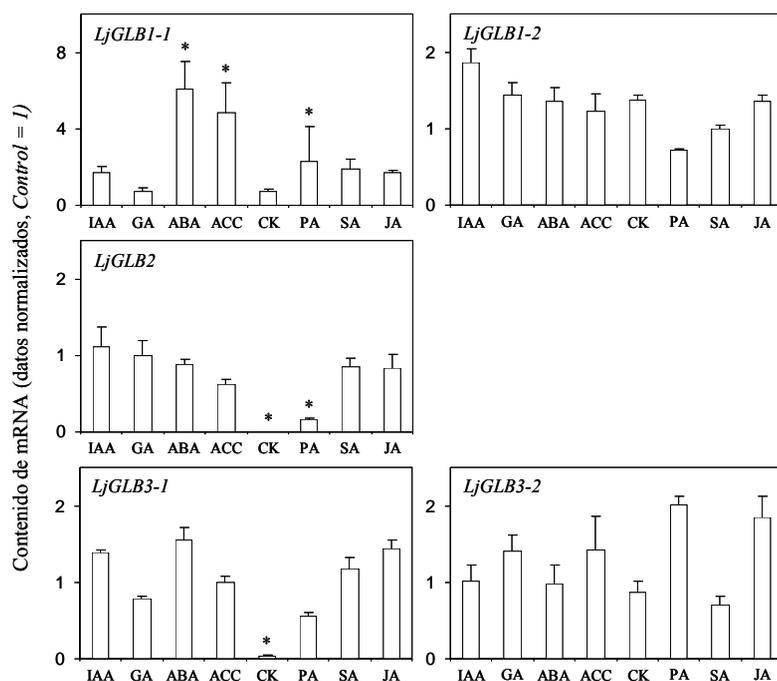


Figura 26. Efecto de diferentes hormonas sobre la expresión de los genes *LjGLB* en nódulos. Los valores de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se relativizaron frente a los de plantas control, a las que se les asignó arbitrariamente un valor de 1. Los datos son medias \pm ES de 4-6 réplicas biológicas de al menos tres series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican inducción ($>2,0$ veces) o represión ($<0,5$ veces) de los genes.

4.3.6. Expresión de los genes *LjGLB* en respuesta a microsimbiontes

Las Hbs no simbióticas no son exclusivas de los nódulos, si bien parecen estar también involucradas en distintos procesos de la interacción con el microsimbionte (Shimoda y cols, 2005; Vieweg y cols, 2005; Nagata y cols, 2008). Para estudiar el efecto de esta interacción sobre la expresión de los genes *LjGLB* se cuantificaron por qRT-PCR los niveles de mRNA 6 y 24 h después de la inoculación. Para verificar que *M. loti* estaba interaccionando con la raíz de la planta de manera específica, también incluimos en el experimento un rizobio no compatible (*R. leguminosarum*) y utilizamos *LjNin* como gen control. Este gen codifica un regulador transcripcional que actúa en los estadios iniciales de la nodulación (Borisov y cols, 2003).

Las plántulas de 15 d que habían crecido en placas Petri se inocularon con *M. loti* y *R. leguminosarum* (Fig. 27). Se observó que la transcripción de *LjNIN* se induce a las 6 h (3 veces) después de la inoculación con *M. loti*, siendo la inducción mucho más intensa a las 24 h (5 veces). La expresión de los genes *LjGLB1-2*, *LjGLB3-1* y *LjGLB3-2* no varió

en las condiciones estudiadas; por el contrario, *LjGLB1-1* disminuye su expresión 24 h después de la inoculación con ambos microsimbiontes, mientras que la expresión de *LjGLB2* aumenta a las 24 h en respuesta a la inoculación con *M. loti*.

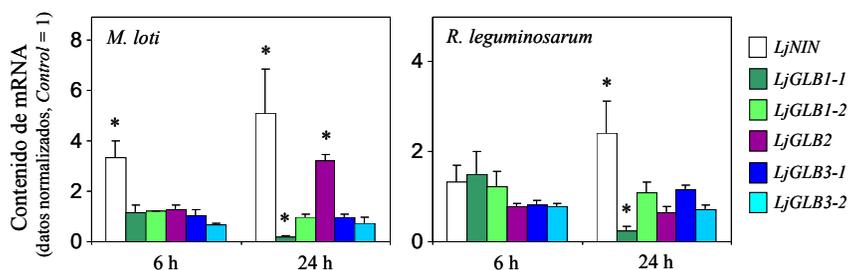


Figura 27. Efecto de la interacción de plántulas de *L. japonicus* con *M. loti* y *R. leguminosarum* sobre la expresión de las Hbs no simbióticas y truncadas. Como gen control de la interacción se usó *LjNIN*. Los valores de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se relativizaron frente al de plantas control, a las que se les asignó arbitrariamente un valor de 1. Los datos son medias \pm ES de 5-6 réplicas biológicas de al menos dos series de plantas crecidas de manera independiente. Los asteriscos indican inducción ($> 2,0$ veces) o represión ($< 0,5$ veces) de los genes respecto a los valores control.

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. Respuesta antioxidante de *Lotus japonicus* al estrés salino

5.1.1. Estado fisiológico de la planta y daño oxidativo

En esta Tesis nos propusimos estudiar el efecto de la salinización en la expresión de más de 20 genes antioxidantes en hojas y raíces de *L. japonicus*. Con este fin se cuantificó el contenido de mRNA y, para la mayoría de los genes, también la correspondiente proteína y actividad enzimática.

En primer lugar, examinamos el efecto de dos tipos de tratamientos salinos (S1 y S2) sobre algunos marcadores fisiológicos y bioquímicos. La comparación entre los tratamientos S1 y S2 nos permitió extraer algunas conclusiones importantes. Las plantas S1 mostraron una disminución del Ψ_w foliar, pero no acumulación de Na^+ o cambios en los contenidos de K^+ y Ca^{2+} en las hojas. Se produjo también un descenso del área foliar por planta y un ligero aumento en el PS de la parte aérea. Por consiguiente, la salinidad en las plantas S1 tiene exclusivamente un efecto osmótico, que se evidencia también por el incremento de la concentración de prolina en hojas y raíces. La prolina es un osmoprotector, sintetizado rápidamente en respuesta a la deshidratación celular, que puede tener funciones adicionales en la eliminación de ROS y en la regulación de genes de respuesta a estrés (Zhu, 2001; Khedr y cols, 2003; Díaz y cols, 2005). La

deshidratación del tejido foliar en las plantas S1 puede disminuir la expansión celular y por tanto el área de las hojas de nueva formación, sin detrimento del PS de la parte aérea. En comparación con las plantas S1, la prolongada salinización experimentada por las plantas S2 no causó ningún descenso en el Ψ_w foliar, pero sí una disminución del PS de la parte aérea, del área foliar y del contenido de K^+ , mientras que aumentó la concentración de Na^+ , Ca^{2+} , prolina y malondialdehído. Estos resultados indican que las plantas S2 sufren el efecto tóxico del NaCl, además del efecto osmótico observado en las plantas S1. El efecto tóxico observado en las plantas S2, que conlleva un ligero retraso del crecimiento, alteración de la homeostasis del K^+ y Ca^{2+} y peroxidación de lípidos, ha sido descrito anteriormente en plantas expuestas al estrés salino durante largos periodos de tiempo (Cavalcanti y cols, 2004; Sánchez y cols, 2008). Sin embargo, en contra de lo descrito por otros autores (Hernández y cols, 1999; Sánchez y cols, 2008), en este trabajo hemos observado que el estrés salino no tiene ningún efecto en el contenido foliar de Mg, P, S, Fe y Mn, y que provoca un incremento, en vez de descenso, en el contenido de Zn. Estos datos indican que el crecimiento de la planta no estuvo limitado en nuestras condiciones experimentales. Teniendo en cuenta el efecto de la salinidad en el crecimiento de la planta, también podemos concluir que *L. japonicus* es más tolerante que otras leguminosas de interés agronómico. Así, el PF de la parte aérea no varió en el tratamiento S1 y se redujo un 82% en S2 en esta leguminosa, mientras que disminuyó un 40% en plantas de guisante tratadas con NaCl 100 mM durante 14 d (Hernández y cols, 1999) y un 84% en plantas de judía tratadas con NaCl 100 mM durante 12-14 d (Jungklang y cols, 2004). Una posible explicación de esta relativa tolerancia de *L. japonicus* es su capacidad para evitar que el Na^+ alcance la parte aérea en las plantas S1. Incluso en las plantas S2, el Na^+ aumenta 2,6 veces, cifra considerablemente menor que el incremento de 47 veces que tiene lugar en guisante (Hernández y cols, 1999).

5.1.2. Expresión de enzimas antioxidantes

La diferencia entre los tratamientos S1 y S2 también nos permitió interpretar algunos cambios en la expresión génica. En primer lugar se observó la inducción de varios genes *SOD* en hojas, pero no en raíces, de las plantas S1. Este hecho revela que estas plantas perciben el estrés salino, aunque sólo su componente osmótico, ya que no se observó ninguna acumulación de iones o daño oxidativo con este tratamiento. Asimismo, podemos concluir que los genes *SOD* se inducen en respuesta a la deshidratación celular

y no propiamente a la salinización, lo cual sería coherente con la sobreproducción en cloroplastos de $O_2^{\cdot-}$, sustrato de las SODs, durante la desecación (Menconi y cols, 1995). A tenor de los resultados obtenidos en esta Tesis, proponemos que las plantas S1 evitan el daño oxidativo mediante una combinación de dos factores: la exclusión de Na^+ en las hojas y la activación de los genes *SOD*. Esta activación puede estar desencadenada por un incremento en la producción de ROS como consecuencia de la deshidratación celular. Por otro lado, en las hojas de las plantas S2 se produce una acumulación de Na^+ que tiene efectos negativos en el crecimiento y metabolismo de la planta.

El aumento de los niveles de mRNA de las SODs en las plantas S1 no se refleja en cambios en el contenido de proteína o actividad enzimática. Esto mismo ha sido observado en otras plantas y puede deberse, entre otros factores, a una regulación post-transcripcional de las enzimas (Attia y cols, 2008). En este sentido, el mecanismo de inducción de los genes *CuZnSODc* y *CuZnSODp* por el estrés salino no tiene por qué ser necesariamente transcripcional. Así, en plantas de *A. thaliana* expuestas a estrés oxidativo, los niveles de mRNA de estos dos genes *CuZnSOD* están regulados por microRNAs específicos (Sunkar y cols, 2006). El incremento de actividad *CuZnSODc* en las plantas S2 podría también reflejar el retraso entre la activación génica, que ocurre en las plantas S1 (con una exposición más corta al estrés salino) y la síntesis de la enzima funcional, que tendría lugar en las plantas S2 (con una exposición más prolongada al estrés salino). Por otro lado, el aumento de los niveles de mRNA de SOD en hojas pero no en raíces podría estar relacionado con la necesidad de proteger la maquinaria fotosintética de los cloroplastos, uno de los compartimentos celulares con mayor producción de ROS en plantas (Asada, 1984). Esta explicación encajaría, además, con la inducción en hojas de algunos genes que codifican importantes enzimas antioxidantes en cloroplastos, tales como *CuZnSODp*, *FeSODp*, *APXs*, *GPX1* y *GPX6* (Rubio y cols, 2009b).

La expresión de las enzimas implicadas en la eliminación del H_2O_2 se estudió en hojas y raíces en condiciones de estrés salino. En raíces, los niveles de mRNA de la catalasa aumentaron en el tratamiento S1 pero disminuyeron en el S2, si bien estos cambios no tuvieron repercusión en los niveles de proteína y actividad. Se observaron variaciones de los niveles de mRNA de algunas enzimas del ciclo ascorbato-glutatión. Los niveles de mRNA de *APXt* y *APXs* mostraron un patrón opuesto en las hojas de las plantas S1, mientras que el nivel de mRNA de la *GRC* disminuyó significativamente en

las raíces. Por otro lado, no se detectaron cambios en la actividad enzimática o en las concentraciones de metabolitos del ciclo ascorbato-glutati6n, lo que sugiere que este ciclo es funcional en las plantas S1 y S2. No obstante, hay que recalcar la inducci6n de la expresi6n de DRc en hojas y raices. Los niveles de mRNA y proteina aumentaron en las plantas S1 y S2, mientras que la actividad enzimática se increment6 solamente en las S2. Debido a que estos cambios no fueron acompa1ados de variaciones en otras actividades o en los metabolitos del ciclo ascorbato-glutati6n, la enzima DR desempe1arí a funciones adicionales. Una de ellas estarí a relacionada con la necesidad de mantener el ascorbato reducido en el apoplasto, y quizás en otros compartimentos, ya que el ascorbato es un cofactor de varias enzimas implicadas en la formaci6n y estabilizaci6n de las paredes celulares y en la sntesis de hormonas (Arrigoni y De Tullio, 2002). Aunque no se ha detectado DR en el apoplasto, éste contiene hasta el 10% del ascorbato total de hojas (Pignocchi y Foyer, 2003). En el apoplasto, el ascorbato se oxida rápidamente y el DHA necesita pasar de nuevo a la c6lula para su reducci6n por la DRc (Pignocchi y Foyer, 2003). Así, la necesidad de una elevada actividad DR en el citosol asociada con la regeneraci6n de ascorbato en el apoplasto podrí a explicar, al menos en parte, por qué el gen *DRc*, y no el *DRp*, se induce en *L. japonicus* durante el estr6s salino.

A pesar del mantenimiento de las defensas antioxidantes, en las plantas S2 se produce da1o oxidativo, a juzgar por la acumulaci6n de malondialdehí do. Esta observaci6n tendrí a dos posibles explicaciones: (a) el malondialdehí do se genera a nivel de las membranas y no en la fracci6n soluble de las c6lulas, y los antioxidantes podrí an ser insuficientes para evitar la peroxidaci6n de las membranas; y (b) el da1o oxidativo es el resultado de un exceso en la producci6n de ROS y no de una protecci6n antioxidante insuficiente, como se ha propuesto para n6dulos senescentes de soja (Evans y cols, 1999).

5.2. Regulaci6n de las tiol sintetasas de *Lotus japonicus* en respuesta a óxido nítrico y hormonas

En las plantas el GSH es un antioxidante muy abundante pero tambi6n desempe1a otras muchas funciones, tales como la regulaci6n del ciclo celular, desarrollo de la planta, transporte y almacenamiento de azufre, respuesta a estr6s y destoxificaci6n de metales pesados (Maughan y Foyer, 2006). En leguminosas, existe otro tripéptido relacionado estructuralmente, el hGSH, que puede reemplazar parcial o totalmente al GSH y ejercer

las funciones del GSH o quizás algunas diferentes a ellas (Frendo y cols, 2001; Matamoros y cols, 2003).

La síntesis de GSH se realiza en dos reacciones consecutivas dependientes de ATP catalizadas por la γ ECS y la GSHS, mientras que la síntesis de hGSH comparte la primera enzima y posteriormente requiere una hGSHS específica. Para profundizar más en los mecanismos de regulación de biosíntesis de GSH y hGSH en leguminosas, en esta Tesis se quiso determinar los patrones de expresión de los genes que codifican las tres tiol sintetasas en *L. japonicus* en respuesta a tratamientos con hormonas, que son cruciales en el desarrollo de la planta y en la señalización del estrés (Fujita y cols, 2006; Balbi y Devoto, 2008).

En plantas, las IAA y CKs son necesarias para el desarrollo de los meristemos apicales y radicales, entre otras funciones (Dello Ioio y cols, 2008). Nuestros datos revelan que estos dos tipos de hormonas tienen un efecto similar en la regulación transcripcional de la biosíntesis de tioles. De hecho, el resultado más relevante es que tanto IAA como CKs inducen la expresión de *GSHS* pero apenas tienen efecto sobre la expresión de los otros dos genes. Estos resultados están de acuerdo con lo demostrado en *A. thaliana*, donde el GSH interviene en el control de la división celular y en el crecimiento del ápice de los pelos radicales (Sánchez-Fernández y cols, 1997), siendo necesario para la transición de la fase G1 a S (Vernoux y cols, 2000). La inducción de *GSHS* por IAA y CKs movilizaría por lo tanto la síntesis de GSH, lo que explicaría algunos de los efectos de ambas hormonas en la división y diferenciación celular. Además, la regulación diferencial de *GSHS* y *hGSHS* podría indicar que GSH y hGSH no son funcionalmente equivalentes, al menos en el control del ciclo celular.

Las PAs son uno de los compuestos más importantes en la señalización celular del estrés abiótico (Bouchereau y cols, 1999; Fujita y cols, 2006). Existen evidencias de que las PAs están implicadas en la tolerancia a estrés, promueven la actividad mitótica y son necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos y para completar el ciclo celular (Bouchereau y cols, 1999; Alcázar y cols, 2006).

Es importante remarcar que las tres hormonas implicadas en la división celular (IAA, CKs y PAs) inducen la expresión de *GSHS* pero no de *hGSHS*, lo que sugiere una función específica del GSH en este proceso. Puesto que varias hormonas, incluidas las CKs y PAs, pueden inducir la síntesis de NO (Neill y cols, 2003; Tun y cols, 2006), se estudió el efecto del SNAP, un compuesto donador de NO, sobre los genes de las tiol sintetasas en

raíces de plantas de 15 d. El gen γ ECS responde a PAs y NO a las 24 h de tratamiento, mientras que el *GSHS* se induce a este tiempo con IAA, CKs, PAs y NO. Este patrón de expresión podría indicar que la respuesta a algunas hormonas de los genes γ ECS y *GSHS*, pero no del gen *hGSHS*, está mediada a nivel transcripcional por NO. En el caso de las PAs, nuestros datos apoyarían la hipótesis de que esta hormona regula directa o indirectamente la síntesis de NO (Tun y cols, 2006; Yamasaki y Cohen, 2006). Además, el GSH puede reaccionar con el NO formando GSNO, que constituye un reservorio y donador endógeno de NO en las células (Besson-Bard y cols, 2008). Por ello, parece lógico que la célula responda a un aumento del NO con una mayor expresión de los genes implicados en la síntesis de GSH. Nuestros resultados nos permiten conjeturar que el hGSH no actuaría como reservorio de NO y que el GSH y hGSH podrían desempeñar al menos algunas funciones distintas dentro de la célula, en contra de lo propuesto por otros autores (Frendo y cols, 2001).

Los resultados obtenidos en raíces de *L. japonicus* indican que la expresión de *hGSHS* es mayor que la de *GSHS*. Para estudiar esta observación con más detalle, determinamos la actividad hGSHS y el contenido en hGSH mediante HPLC y así averiguar a qué nivel se produce la regulación de la síntesis de este tiol en respuesta a hormonas. La conclusión fue que, en raíces tratadas con IAA, CKs o PAs, la abundancia relativa del transcrito de *hGSHS* se corresponde con la de la actividad hGSHS, pero no con el contenido en hGSH, lo que implica que probablemente existe una regulación post-traducciona l de la síntesis de hGSH en raíces de *L. japonicus* en respuesta a hormonas.

5.3. Hemoglobinas no simbióticas y truncadas de *Lotus japonicus*

5.3.1. Estructura de los genes *LjGLB* y análisis filogenético de las proteínas

El genoma de *L. japonicus* contiene tres genes que codifican Lbs típicas, que se expresan de manera muy abundante en los nódulos (Uchiumi y cols, 2002). Sin embargo, esta leguminosa, como otras plantas, contiene también Hbs no simbióticas y truncadas, cuyas funciones son muy poco conocidas. Uno de los objetivos de esta Tesis fue caracterizar los genes *LjGLB* y determinar su patrón de expresión en los diferentes órganos y tejidos de la planta.

Una búsqueda en librerías genómicas y de ESTs de *L. japonicus* nos permitió aislar los clones genómicos y de cDNA que contenían la secuencia parcial o completa de cinco genes *LjGLB* (Bustos-Sanmamed y cols, 2011). El análisis filogenético de las secuencias teóricas de las proteínas, junto con la estructura de los genes, confirmaron sus asignaciones a las tres clases de Hbs. Así, el dendrograma evidencia un clado completamente separado para las GLB3s, confirmando que estas proteínas forman una familia distinta de las Hbs simbióticas y no simbióticas (Wittenberg y cols, 2002). Asimismo, se observan clados estrechamente relacionados para las GLB1s y GLB2s. Al igual que en *L. japonicus*, las Lbs de otras leguminosas y la Hb simbiótica de *Casuarina glauca* presentan una elevada homología con las Hbs no simbióticas de clase 2 (Appleby, 1992; Trevaskis y cols, 1997). El dendrograma muestra también una alta homología entre las Hbs no simbióticas de clase 2 y las Lbs, coherente con sus similares propiedades bioquímicas (Trevaskis y cols, 1997). De hecho, se ha propuesto que las Lbs proceden de una Hb no simbiótica ancestral que, mediante duplicación y evolución por divergencia, adquirió una función más especializada en el nódulo (Andersson y cols, 1996; Hardison, 1998). En el caso de *L. japonicus*, esta Hb ancestral habría originado, además, la *LjGLB2*.

Los cinco genes *LjGLB* contienen cuatro exones y tres intrones en posiciones homólogas a los de otros genes *Hb* de plantas vasculares y no vasculares (Hunt y cols, 2001). Los exones 2, 3 y 4 de *LjGLB1-1*, *LjGLB1-2* y *LjGLB2* y sus ortólogos en *A. thaliana* tienen el mismo tamaño, mientras que las *LjGLB3* tienen un tamaño idéntico al de *AtGLB3* para los tres primeros exones y pequeñas diferencias para el exón 4 (Bustos-Sanmamed y cols, 2011). Esta organización de los genes *LjGLB3* y *AtGLB3* y la elevada identidad (65-87%) entre las secuencias de *LjGLB3* y GLB3s de otras plantas reflejan un alto grado de conservación entre las Hbs truncadas. Esto es evidente en el dendrograma, en el que las GLB3s definen una rama completamente separada. Las proteínas predichas para *LjGLB3s* son 8-17 aminoácidos más largas que las *LjGLB1s* y *LjGLB2*. El tamaño mayor de las GLB3s parece ser una característica común en plantas, al contrario que ocurre con las Hbs truncadas de origen bacteriano, que son 20-40 residuos más cortas que las Hbs no simbióticas (Vinogradov y cols, 2006; Jokipii-Lukkari y cols, 2009).

5.3.2. Expresión diferencial de los genes *LjGLB* en órganos vegetales

El perfil de expresión de los cinco genes se realizó mediante qRT-PCR en plantas que crecieron en cultivo hidropónico. Las hojas, tallos, raíces y nódulos fueron cosechados a los 45 d (en el periodo vegetativo de crecimiento), mientras que las flores y frutos se cosecharon en plantas de 60 d (cuando las vainas alcanzaron *c.* 3,5 cm).

Los resultados obtenidos para los genes *LjGLB* concuerdan con los de otras Hbs no simbióticas y truncadas, que se expresan en todos los tejidos de *A. thaliana* (Trevaskis y cols, 1997; Watts y cols, 2001), soja (Anderson y cols, 1996; Lee y cols, 2004) y monocotiledóneas (Ross y cols, 2004). Sin embargo, en este trabajo hemos encontrado, por vez primera, que los genes de las tres clases de Hbs se expresan muy marcadamente en los nódulos. Este hecho sugiere que las tres clases de Hbs son necesarias para el funcionamiento del nódulo y que están localizadas en diferentes compartimentos celulares y/o realizan funciones complementarias. Para estudiar esta cuestión más detalladamente, se localizaron los mRNAs de los cinco genes en los nódulos y se determinaron los efectos del NO, condiciones de estrés y hormonas en la expresión de los genes en raíces y nódulos.

5.3.3. Localización de los transcritos de los genes *LjGLB* en nódulos

Los transcritos de *LjGLBs* se localizaron en nódulos maduros mediante hibridación *in situ* usando sondas marcadas con UTP-digoxigenina. Los transcritos de *LjGLBI-1* y *LjGLBI-2* se localizaron principalmente en la zona de infección y en los haces vasculares. Esta localización en la zona de infección y haces vasculares coincide con los resultados obtenidos por Shimoda y cols (2009), quienes observaron que la actividad del promotor *LjGLBI-1* se localiza en los haces vasculares y en la zona infectada de nódulos maduros y que esta localización se corresponde con la de producción de NO. Además de estas dos localizaciones, nosotros pudimos detectar niveles de mRNA significativos en la zona del córtex. En el caso de *LjGLBI-2*, no hubo señal de fondo en el córtex por lo que la localización del transcrito es muy precisa. Sin embargo, en el caso de *LjGLBI-1*, la sonda control produjo una señal leve en el córtex y por ello no podemos asegurar la presencia de una señal no específica en este tejido del nódulo. Aunque el mRNA de ambos genes tiene la misma localización en los nódulos, *LjGLBI-2* se expresa en todos los órganos de la

planta y su transcrito es especialmente abundante en las hojas, lo que sugiere una función distinta para las proteínas LjGLB1-1 y LjGLB1-2.

Los transcritos de *LjGLB2* y *LjGLB3-2* se localizaron principalmente en el córtex y en los haces vasculares, lo que coincide con los resultados de localización de actividad génica utilizando fusiones promotor-GUS en nódulos maduros transgénicos (Bustos-Sanmamed y cols, 2011). La mayor expresión de *LjGLB3-1* comparada con la de *LjGLB3-2* en nódulos de *L. japonicus*, también observada en *M. truncatula* (Vieweg y cols, 2005), sugiere que *LjGLB3-1* pero no *LjGLB3-2* participa específicamente en la simbiosis. Comparando nuestros resultados con los obtenidos previamente para nódulos indeterminados de *M. truncatula* (Vieweg y cols, 2005), es interesante destacar que estos autores observaron expresión de *GLB3-1* y *GLB3-2* predominantemente en las células infectadas y en los haces vasculares, respectivamente.

Podemos concluir que las tres clases de Hb se expresan abundantemente en los nódulos, localizándose en ciertos tejidos como el córtex o los haces vasculares y, para algunos genes y etapas del desarrollo del nódulo, también en la zona infectada. El caso más evidente es la colocalización de *LjGLBs* en los haces vasculares del nódulo. Estas células, que incluyen a las células acompañantes del floema y xilema y las células del parénquima floemático, muestran alta actividad metabólica y contienen altos niveles de enzimas antioxidantes para proteger los componentes celulares de las ROS generadas en las mitocondrias (Rubio y cols, 2009a). Las células de los haces vasculares exhiben una elevada actividad respiratoria para producir el ATP necesario para el transporte de metabolitos. De hecho, las proteínas LjGLB1 podrían contribuir a mantener unos niveles adecuados de ATP en condiciones de hipoxia, tal como se ha descrito para las proteínas GLB1 de monocotiledóneas (Igamberdiev y Hill, 2004). Asimismo, las proteínas LjGLB podrían unirse a determinados ligandos o moléculas señal que se transportan por los haces vasculares. Así, hay que señalar que las células del xilema y floema generan altas tasas de NO (Gabaldón y cols, 2005; Gaupels y cols, 2008), lo que apoyaría el papel de LjGLB1-1 en el metabolismo de NO en los haces vasculares.

5.3.4. Regulación de la expresión de los genes *LjGLB* en respuesta a óxido nítrico, estrés abiótico y hormonas

Trabajos anteriores evidencian que las proteínas GLB1 están involucradas en la regulación de los niveles de NO (Igamberdiev y Hill, 2004). Además, algunos genes

GLB1 en *L. japonicus* y *A. firma* responden a NO, y se ha propuesto que estas proteínas juegan un papel en la detoxificación del NO durante la simbiosis (Shimoda y cols, 2005; Sasakura y cols, 2006). En esta Tesis hemos analizado los patrones de expresión de los cinco genes *LjGLB* en raíces tratadas con dos donadores de NO para comparar el efecto del SNAP y el SNP en la expresión, tomando *LjGLB1-1* como control. Nuestros resultados indican que *LjGLB1-1* es el único gen *LjGLB* que responde al NO, sugiriendo que la *LjGLB1-1*, y no la *LjGLB1-2*, está involucrada en el metabolismo del NO. En nódulos de *L. japonicus*, se ha propuesto una función de la *LjGLB1-1* y las Lbs en la eliminación y/o el metabolismo del NO, puesto que ambos tipos de hemoproteínas muestran una alta afinidad por el NO *in vitro* (Mathieu y cols, 1998; Dordas y cols, 2004; Meakin y cols, 2007). Las condiciones de microaerobiosis, la alta producción de NO y la abundancia de Lbs en los nódulos serían también favorables para el funcionamiento del ciclo “Hb/NO”, tal como parece ocurrir en las raíces en condiciones de hipoxia (Igamberdiev y Hill, 2004).

Los genes de Hbs de plantas también responden a las condiciones de estrés y a la adición de sacarosa. Así, *AtGLB1* se induce con la hipoxia y la sacarosa, y *AtGLB2* con el estrés por frío (Trevaskis y cols, 1997). El gen *GLB1* de *A. firma* se induce igualmente en respuesta a las bajas temperaturas (Sasakura y cols, 2006), mientras que *LjGLB1-1* se induce por hipoxia y estrés por frío, y *LjGLB1-2* por sacarosa (Shimoda y cols, 2005). En esta Tesis hemos estudiado los efectos de la hipoxia, bajas temperaturas y sacarosa en la expresión de los genes *LjGLB* en raíces de plántulas que crecieron durante 15 d en placas Petri. En contra de los análisis de expresión descritos por Shimoda y cols (2005), en este trabajo hemos encontrado que la sacarosa induce el gen *LjGLB1-1* en las raíces. Esta discrepancia puede ser atribuida a la utilización, por dichos autores, de RNA de la planta completa en vez de RNA de la raíz. Por otra parte, la falta de respuesta de *LjGLB1-2* al estrés por frío es coherente con lo observado en el gen ortólogo de *A. thaliana*, *AtGLB2*, que se induce por bajas temperaturas en hojas pero no en raíces (Trevaskis y cols, 1997), lo cual sugiere un efecto dependiente de tejido.

Las hormonas están implicadas en múltiples funciones dentro de la planta como son la morfogénesis y la respuesta a estrés. Ya que las Hbs pueden actuar como sensores de estrés o moduladores metabólicos en respuesta a factores de desarrollo o ambientales, en este trabajo hemos estudiado el efecto de las hormonas en la expresión de los genes de las

Hbs. Hasta ahora la información existente acerca de este tema se restringe a unas pocas hormonas o genes (por ejemplo, consultar Hunt y cols, 2001; Shimoda y cols, 2005).

Los resultados obtenidos en esta Tesis ponen de manifiesto la existencia de diferentes mecanismos regulatorios en la expresión de *Hbs* para cada hormona, gen y órgano. Esta conclusión se apoya en las siguientes observaciones. Primero, los genes *LjGLB*, incluso aquellos pertenecientes a la misma clase de Hb, tienen patrones de expresión específicos en respuesta a hormonas. Algunos ejemplos son el efecto opuesto de ACC y CKs en *LjGLB1-1* (inducción) y *LjGLB1-2* (represión), o el efecto de ACC y PAs en *LjGLB3-1* (inducción) y *LjGLB3-2* (sin cambios en la expresión) en raíces. Segundo, las hormonas pueden tener efectos opuestos en función del órgano de la planta. A este respecto, pudimos observar en raíces una fuerte inducción de *LjGLB1-1* por las CKs y de *LjGLB2* y *LjGLB3-1* por las PAs, mientras que en nódulos la expresión de *LjGLB2* y *LjGLB3-1* fue suprimida en respuesta a CKs. La inducción de *LjGLB1-1* por las CKs también ha sido observada, aunque con menos intensidad, en plántulas de 10 d de *L. japonicus* crecidas en placas de agar y tratadas con 10 μ M de bencilaminopurina durante 24 h; sin embargo, esta CK no tuvo ningún efecto en la expresión de *LjGLB1-2* en la planta entera (Shimoda y cols, 2005). Tercero, las PAs y el JA causaron una fuerte inducción de *LjGLB1-1* en las raíces. Estos efectos podrían estar mediados por NO, ya que sólo este gen respondió a NO, y el tratamiento de plantas de *A. thaliana* con PAs o JA parece estar relacionado con un incremento de NO (Huang y cols, 2004; Tun y cols, 2006). Sin embargo, las PAs también podrían actuar mediante mecanismos independientes de NO, ya que este tipo de hormonas son capaces de inducir la expresión de *LjGLB2* y *LjGLB3-1*.

La aplicación exógena de CKs causa una fuerte represión, o la completa inactivación, de la expresión de *LjGLB2* en raíces y nódulos, *LjGLB3-2* en raíces, y *LjGLB3-1* en nódulos. Es probable que los elementos *cis* que responden a CKs estén ampliamente distribuidos en los promotores de los genes *GLB* y no sólo restringidos a los genes *GLB2* (Hunt y cols, 2001). Esta hipótesis es coherente con la observación de que el factor de transcripción ARR1, regulado por CKs, activa al promotor de un gen *GLB1* de arroz (Ross y cols, 2004). El efecto de las CKs en la expresión génica puede variar según las especies, el tejido y la edad de la planta. Aparte del conocido efecto de las CKs en el control de la diferenciación de meristemos en *A. thaliana* y en otras plantas no leguminosas, las CKs se han relacionado también con el proceso simbiótico de las leguminosas, ya que mutantes en el principal receptor de estas hormonas, CRE1, son

deficientes en la nodulación (Frugier y cols, 2008). Los importantes cambios observados en la expresión de las Hb en los nódulos y raíces en respuesta a CKs podrían estar relacionados con las rutas de señalización de esta hormona en la raíz durante la organogénesis y actividad del nódulo. Por otro lado, el hecho de que los genes de las Hbs truncadas respondan al tratamiento con CKs sugiere que ambas proteínas comparten una misma función en los procesos regulados por esta hormona pero en distintos tejidos, siendo más importante *LjGLB3-1* en los nódulos y *LjGLB3-2* en raíces.

5.3.5. Regulación de la expresión de los genes *LjGLB* en la interacción con microsimbiontes

Las Hbs no simbióticas y truncadas pueden estar también involucradas en el proceso de nodulación. Se ha propuesto que la proteína *LjGLB1-1* modula la concentración de NO de los nódulos, evitando que se inhiba la nitrogenasa (Shimoda y cols, 2009). Por otra parte, la respuesta de los genes *LjGLB2* y *LjGLB3-1* a CKs en los nódulos y sus elevados niveles de expresión, especialmente en el córtex, zona infectada y haces vasculares de nódulos jóvenes, apoyan la hipótesis de que *LjGLB2* y *LjGLB3-1* intervienen en el desarrollo del nódulo, al igual que se ha propuesto para el gen *GLB3-2* de *M. truncatula* (Vieweg y cols, 2005).

En esta Tesis, para confirmar la posible implicación de *LjGLB2* y *LjGLB3* en la nodulación, hemos estudiado los patrones de expresión en respuesta a la interacción con el microsimbionte *M. loti*. Puesto que la respuesta de las Hbs en la interacción con el rizobio podría deberse a una respuesta defensiva de la planta hacia la bacteria, se estudió también la interacción con *R. leguminosarum*. Además, para verificar que había una interacción del rizobio con la raíz de *L. japonicus*, se usó el gen *LjNIN*, un regulador transcripcional que actúa en los estadios iniciales de la nodulación (Borisov y cols, 2003), como gen control. A las 6 h del tratamiento ya había una inducción de *LjNIN* en respuesta a con *M. loti* pero no hubo respuesta de ninguno de los genes *LjGLB* estudiados hasta las 24 h. El gen *LjGLB2* se indujo en respuesta al simbiote, lo cual, junto con los resultados de la localización del mRNA y de la actividad del promotor, apoyaría la idea de que *LjGLB2* es necesario en las fases iniciales del establecimiento de la simbiosis.

Shimoda y cols (2005) observaron una inducción de *LjGLB1-1* en plántulas de 10 d a las 4 h de ser inoculadas con *M. loti*. La rápida generación de NO tras la inoculación podría desencadenar una respuesta defensiva; sin embargo, la *LjGLB1-1* y posiblemente

también las Lbs, todas ellas con gran afinidad por el NO, disminuirían la concentración de NO, permitiendo el establecimiento de la simbiosis. A las 6 h los niveles de expresión de *LjGLBI-1* son similares a los de plantas control y a las 24 h se muestra una cierta represión de este gen, lo que podría atribuirse a un mecanismo de autorregulación de su actividad tras inducción inicial para inhibir la respuesta defensiva de la planta.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. La leguminosa modelo *Lotus japonicus* es más tolerante a la salinidad (NaCl 150 mM durante 7 días) que algunas leguminosas de interés agronómico como la judía o el guisante, a juzgar por diversos marcadores fisiológicos y bioquímicos. En el tratamiento salino más intenso (NaCl 50-150 mM durante 18 días), la respuesta antioxidante de la planta resulta insuficiente, generándose un estrés oxidativo. La diferente respuesta a los dos estreses salinos es atribuible a la duración de los tratamientos más que a las concentraciones de NaCl aplicadas.

2. Los genes glutatión sintetasa y homoglutatión sintetasa de *L. japonicus* muestran una regulación diferencial en respuesta a moléculas señal como el óxido nítrico y hormonas, y también se expresan de manera diferente en hojas, raíces y nódulos, lo que apoya una distinta función del glutatión y homoglutatión en el desarrollo de la planta. En las raíces, el homoglutatión es el tiol más abundante y su síntesis está regulada post-traduccionalmente.

3. Además de tres genes de leghemoglobinas, en el genoma de *L. japonicus* existen cinco genes que codifican dos hemoglobinas no simbióticas de clase 1 (LjGLB1-1 y LjGLB1-2), una hemoglobina no simbiótica de clase 2 (LjGLB2) y dos hemoglobinas truncadas (LjGLB3-1 y LjGLB3-2). Estos genes se expresan de manera diferencial en los órganos vegetales y en respuesta a óxido nítrico, estrés abiótico y hormonas. Así, el gen *LjGLB1-1* se induce por óxido nítrico, hipoxia y bajas temperaturas en las raíces, mientras

que las citokininas causan una completa inactivación de *LjGLB2* y *LjGLB3-1* en los nódulos y la inducción de *LjGLB1-1* en las raíces.

4. Los transcritos de las hemoglobinas *LjGLB1-1*, *LjGLB2* y *LjGLB3-1* son muy abundantes en los nódulos y se localizan preferentemente en el córtex, en los haces vasculares y, según el estado de desarrollo de los nódulos, también en la zona infectada. Los elevados niveles de expresión de estas hemoglobinas en los nódulos, su localización en los tejidos de nódulos y raíces con alta actividad metabólica y sus distintos mecanismos de regulación nos llevan a proponer que las tres clases de hemoglobinas son esenciales para la simbiosis y desempeñan funciones complementarias.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abadía J, Abadía A** (1993) Iron and Plant Pigments. En LL Barton, BC Hemming eds, Iron Chelation in Plant and Soil Microorganisms. New York, pp 327-343
- Aebi H** (1984) Catalase *in vitro*. Methods Enzymol **105**: 121-126
- Alcázar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T** (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. Biotechnol Lett **28**: 1867-1876
- Andersson CR, Jensen EO, Llewellyn DJ, Dennis ES, Peacock WJ** (1996) A new haemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin in all plants. Proc Natl Acad Sci USA **93**: 5682-5687
- Aparicio-Tejo PM, Arrese-Igor C, Becana M** (2000) Fijación biológica de nitrógeno. En Azcón-Bieto J, Talón M, eds., Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp 193-213
- Apelbaum A, Burgoon AC, Anderson JD, Lieberman M, Ben-Arie R, Mattoo AK** (1981) Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. Plant Physiol **68**: 453-456
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol **55**: 373-399
- Appleby CA, Tjepkema JD, Trinick MJ** (1983) Hemoglobin in a nonleguminous plant, *Parasponia*: possible genetic origin and function in nitrogen fixation. Science **220**: 951-953
- Appleby CA, Bogusz D, Dennis ES, Peacock WJ** (1988) A role for haemoglobin in all plant roots? Plant Cell Environ **11**: 359-367
- Appleby CA** (1992) The origin and function of haemoglobin in plants. Sci Prog **76**: 365-398
- Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Moran JF, Sarath G, Klucas RV** (1998) Plant hemoglobins. Plant Physiol **118**: 1121-1125

- Arrigoni O, De Tullio MC** (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta* **1569**: 1-9
- Asada K** (1984) Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol* **105**: 422-429
- Attia H, Arnaud N, Karray N, Lachaâl M** (2008) Long-term effects of mild salt stress on growth, ion accumulation and superoxide dismutase expression of *Arabidopsis* rosette leaves. *Physiol Plant* **132**: 293-305
- Baker DG** (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol Biol* **8**: 40-49
- Balbi V, Devoto A** (2008) Jasmonate signaling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol* **177**: 301-318
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA** (1999) Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem* **274**: 36729-36733
- Bartoli CG, Pastori GM, Foyer CH** (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol* **123**: 335-343
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID** (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* **39**: 205-207
- Beauchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**: 276-287
- Beligni MV, Lamattina L** (1999) Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* **208**: 337-344
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 21-39
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL** (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**: 332-341
- Bhattacharjee S** (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr Sci* **89**: 1113-1121
- Bogusz D, Applegly CA, Landsmann J, Dennis ES, Trinick MJ, Peacock WJ** (1988) Functioning haemoglobin genes in non-nodulating plants. *Nature* **331**: 178-180
- Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG.** (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interac* **14**: 695-700
- Borisov AY, Madsen LH, Tsyganov VE, Umehara Y, Voroshilova VA, Batagov AO, Sandal N, Mortensen A, Schauser L, Ellis N, Tikhonovich IA, Stougaard J** (2003) The *Sym35* gene required for root nodule development in pea is an ortholog of *Nin* from *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **131**: 1009-1017
- Bouchereau A, Ariz A, Larher F, Martin-Tanguy J** (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* **140**: 103-125
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D** (1994) Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci* **13**: 199-218
- Bradford MM** (1976) A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

- Bridges SM, Salin ML** (1981) Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiol* **68**: 275-278
- Broughton BJ, Dilworth MJ** (1971) Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* **125**: 1075-1080
- Bruno S, Faggiano S, Spyraakis F, Mozzarelli A, Abbruzzetti S, Grandi E, Vaippiani C, Feis A, Mackowiak S, Smulevich G, Cacciatori E, Dominici P** (2007) The reactivity with CO of AHb1 and AHb2 form *Arabidopsis thaliana* is controlled by the distal HisE7 and internal hydrophobic cavities. *J Am Chem Soc* **129**: 2880-2889
- Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T** (2000) A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* **407**: 520-523
- Bustos-Sanmamed P, Tovar-Méndez A, Crespi M, Sato S, Tabata S, Becana M** (2011) Regulation of nonsymbiotic and truncated hemoglobin genes of *Lotus japonicus* in plant organs and in response to nitric oxide and hormones. *New Phytol* (doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03527)
- Cavalcanti FR, Abreu Oliveira JT, Martins-Miranda AS, Viégas RA, Gomes Silveira JA** (2004) Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytol* **163**: 563-571
- Cavalcanti FR, Lima JPMS, Ferreira-Silva SL, Viégas RA, Silveira JAG** (2007) Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. *J Plant Physiol* **164**: 591-600
- Chapin FS, Bloom AJ, Field CB, Waring RH** (1987) Plant responses to multiple environmental factors. *BioScience* **37**: 49-57
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK** (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 444-451
- Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA** (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* **6**: 145-150
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM, del Río LA** (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**: 246-254
- Couture M, Chamberland H, St-Pierre B, Lafontaine J, Guertin M** (1994) Nuclear genes encoding chloroplast hemoglobins in the unicellular green alga *Chlamydomonas eugametos*. *Mol Gen Genet* **243**: 185-197
- Couture M, Das TK, Lee HC, Peisach J, Rousseau DL, Wittenberg BA, Wittenberg JB, Guertin M** (1999) *Chlamydomonas* chloroplast ferrous hemoglobin. Heme pocket structure and reactions with ligands. *J Biol Chem* **274**: 6898-6910
- Dalton DA, Russell SA, Hanus FJ, Pascoe GA, Evans HJ** (1986) Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3811-3815
- Dalton DA, Langeberg L, Treneman NC** (1993) Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiol Plant* **87**: 365-370

- Dalton DA** (1995) Antioxidant defenses of plants and fungi. *En* Ahmad S, ed., *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman and Hall, New York, USA, pp 298-355
- Dalton DA, Joyner SL, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Chatfield JM** (1998) Antioxidant defense in the peripheral cell layers of legume root nodules. *Plant Physiol* **116**: 37-43
- Davenport RJ, Reis RJ, Smith FA** (1997) Sodium-calcium interactions in two wheat species differing in salinity tolerance. *Physiol Plant* **99**: 323-327
- Davies KJA** (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem* **262**: 9908-9913
- De Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collins MD, Kersters K, Dreyfus B, Gillis M** (1998) *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 1277-1290
- Delledonne M** (2005) NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 390-396
- Dello Ioio R, Scaglia Linhares F, Sabatini S** (2008) Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 23-27
- Del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signalling. *Plant Physiol* **141**: 330-335
- D’Haeze W, De Rycke R, Mathis R, Goormachtig S, Pagnotta S, Verplancke C, Capoen W, Holsters M** (2003) Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11789-11794
- Díaz CL, Grönlund M, Schlaman HRM, Spaink HP** (2005) Induction of hairy roots for symbiotic gene expression studies. *En* Márquez AJ, ed. *Lotus japonicus handbook*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, pp 261-277.
- Dietz KJ** (2003) Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 93-107
- Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manach N, Rivoal J, Hill RD** (2003a) Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J* **35**: 763-770
- Dordas C, Rivoal J, Hill RD** (2003b) Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. *Ann Bot* **91**:173-178
- Dordas C, Hasinoff BB, Rivoal J, Hill RD** (2004) Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell-suspension cultures. *Planta* **219**: 66-72
- Dordas C** (2009) Nonsymbiotic hemoglobin and stress tolerance in plants. *Plant Sci* **176**: 433-440
- Durner J, Klessig DF** (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 369-374
- Ellman GL** (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**: 70-77
- Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Morishima I, Shibahara T, Inanaga S, Tanaka K** (2006) Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiol Plant* **127**: 57-65

- Evans PJ, Gallesi D, Mathieu C, Hernández MJ, de Felipe M, Halliwell B, Puppo A** (1999) Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. *Planta* **208**: 73-79
- Fahey R, Newton G** (1987) Determination of low-molecular-weight thiol using monobromobimane fluorescent labeling and high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* **143**: 85-96
- Falzone CJ, Christie VB, Scott NL, Lecomte JT** (2002) The solution structure of the recombinant hemoglobin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in its hemochrome state. *J Mol Biol* **324**: 1015-1029
- Fath A, Bethke PC, Jones RL** (2001) Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiol* **126**: 156-166
- Foyer CH, Doctor G** (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* **28**: 1056-1071
- Frendo P, Hernández-Jiménez MJ, Mathieu C, Duret L, Gallesi D, Van de Sype G, Hérouart D, Puppo A** (2001) A *Medicago truncatula* homogluthathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication. *Plant Physiol* **126**: 1706-1715
- Frugier F, Kosuta S, Murray JD, Crespi M, Szczyglowski K** (2008) Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci* **13**: 115-120
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling network. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 436-442
- Fukao T, Bailey-Serres J** (2004) Plant responses to hypoxia -is survival a balancing act? *Trends Plant Sci* **9**: 449-456
- Gabaldón C, Gómez Ros LV, Pedreño MA, Ros Barceló A** (2005) Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytol* **165**: 121-130
- Garcés H, Durzan D, Pedrosa MC** (2001) Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* **87**: 567-574
- García-Mata C, Lamattina L** (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive cell responses against drought stress. *Plant Physiol* **126**: 1196-1204
- Gaupels F, Furch ACU, Will T, Mur LAJ, Kogel KH, van Bel AJE** (2008) Nitric oxide generation in *Vicia faba* phloem cells reveals them to be sensitive detectors as well as possible systemic transducers of stress signals. *New Phytol* **178**: 634-646
- Gould KS, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D** (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ* **26**: 1851-1862
- Gouvêa CMCP, Souza JF, Magalhaes CAN, Martins IS** (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul* **21**: 183-187
- Gow AJ, Ischiropoulos H** (2001) Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J Cell Physiol* **187**: 277-282
- Griffith OW** (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* **106**: 207-212

- Halliwell B** (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* **141**: 312-322
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Ed 4. Oxford University Press, UK
- Handberg K, Stougaard J** (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J* **2**: 487-496
- Hankeln T, Jaenicke V, Kiger L, Dewilde S, Ungerechts G, Schmitt M, Urban J, Marden M, Moens L, Burmester T** (2002) Characterization of *Drosophila* hemoglobin. Evidence for hemoglobin-mediated respiration in insects. *J Biol Chem* **277**: 29012-29017
- Hardison R** (1998) Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J Exp Biol* **201**: 1099-1117
- Hare PD, Cress WA** (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul* **21**: 79-102
- Hargrove MS, Brucker EA, Stec B, Sarath G, Arredondo-Peter R, Klucas RV, Olson GN, Philips Jr** (2000) Crystal structure of a non-symbiotic plant hemoglobin. *Structure Fold Des* **8**: 1005-1014
- Hebelstrup KH, Hunt P, Dennis E, Jensen SB, Jensen EO** (2006) Hemoglobin is essential for normal growth of *Arabidopsis* organs. *Physiol Plant* **127**: 157-166
- Hell R, Bergmann L** (1988) Glutathione synthetase in tobacco suspension cultures. Catalytic properties and localization. *Physiol Plant* **72**: 70-76
- Hernández JA, Campillo A, Jiménez A, Alarcón JJ, Sevilla F** (1999) Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol* **141**: 241-251
- Hernández JA, Jiménez A, Mullineaux P, Sevilla F** (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ* **23**: 853-862
- Hernández JA, Ferrer MA, Jiménez A, Barceló AR, Sevilla F** (2001) Antioxidant systems and O₂^{·-}/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol* **127**: 817-831
- Herold S, Puppo A** (2005) Oxyleghemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxynitrite: a possible role in functioning nodules? *J Biol Inorg Chem* **10**: 935-945
- Hirsch AM** (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* **122**: 211-237
- Hoy JA, Hargrove MS** (2008) The structure and function of plant hemoglobins. *Plant Physiol Biochem* **46**: 371-379
- Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J** (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**: 938-946
- Hunt PW, Watts RA, Trevaskis B, Llewelyn DJ, Burnell J, Dennis ES, Peacock WJ** (2001) Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants. *Plant Mol Biol* **47**: 677-692
- Hunt PW, Klok EJ, Trevaskis B, Watts RA, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES** (2002) Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and

- promotes early growth in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA **99**: 17197-17202
- Igamberdiev AU, Hill RD** (2004) Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classical fermentation pathways. J Exp Bot **55**: 2473-2482
- Igamberdiev AU, Seregelyes C, Manac'h N, Hill RD** (2004) NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. Planta **219**: 95-102
- Ignarro LJ** (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium derived nitric oxide. Annu Rev Pharmacol Toxicol **30**: 535-560
- Innocenti G, Pucciarello C, Le Gleuher M, Hopkins J, de Stefano M, Delledone M, Puppo A, Baudouin E, Frendo P** (2007) Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. Planta **225**: 1597-1602
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J **6**: 3901 -3907
- Jiang Y, Deyholos M** (2006) Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. BMC Plant Biol **6**: 25-45
- Jiménez-Bremont JF, Ruíz OA, Rodríguez-Kessler M** (2007) Modulation of spermidine and spermine in maize seedling subjected to long-term salt stress. Plant Physiol Biochem **45**: 812-821
- Jokipii-Lukkari S, Frey AD, Kallio PT, Häggman H** (2009) Intrinsic non-symbiotic and truncated haemoglobins and heterologous *Vitreoscilla* haemoglobin expression in plants. J Exp Bot **60**: 409-422
- Joo JH, Bae YS, Lee JS** (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. Plant Physiol **126**: 1055-1060
- Jungklang J, Sunohara Y, Matsumoto H** (2004) Antioxidative enzymes response to NaCl stress in salt-tolerant *Sesbania rostrata*. Weed Biol Manag **4**: 81-85
- Kanazawa S, Sano S, Koshiha T, Ushimaru T** (2000) Changes in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence. Physiol Plant **109**: 211-216
- Kanematsu S, Asada K** (1990) Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. Plant Cell Physiol **31**: 99-112
- Kehrer JP** (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology **149**: 43-50
- Keppler L** (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen oxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybeans plants. Atmos Environ **13**: 537-542
- Khedr AHA, Abbas MA, Abdel Wahid AA, Quick WP, Abogadallah GM** (2003) Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt stress. J Exp Bot **54**: 2553-2562
- Kim SY, Lim JH, Park MR, Kim YJ, Park TH, Seo YW, Choi KG, Yun SJ** (2005) Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. J Biochem Mol Biol **38**: 218-224
- Klapheck S** (1988) Homoglutathione: Isolation, quantification and occurrence in legumes. Physiol Plant **74**: 727-732

- Kocsy G, Brunner M, Ruegsegger A, Stamp P, Brunold C** (1996) Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivities to chilling. *Planta* **198**: 365-370
- Kramlich JC, Linak WP** (1994) Nitrous oxide behaviour in the atmosphere, and in combustion and industrial systems. *Prog Energ Combust* **20**: 149-202
- Kubo H** (1939) Über hämoprotein aus den wurzelknöllchen von leguminosen. *Acta Phytochimica* (Tokyo) **11**: 195-200
- Kundu S, Trent JT, Hargrove M** (2003) Plants, humans and hemoglobins. *Trends Plant Sci* **8**: 387-393
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G** (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 109-136
- Landsmann J, Dennis ES, Higgins TJV, Appleby CA, Kortt AA, Peacock WJ** (1986) Common evolutionary origin of legume and non-legume plant haemoglobins. *Nature* **324**: 166-168
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG** (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948
- Lee H, Kim H, An CS** (2004) Cloning and expression analysis of 2-on-2 hemoglobin from soybean. *J Plant Biol* **47**: 92-98
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* **148**: 350-382
- Lichtenthaler HK** (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol* **148**: 4-14
- Lichtenthaler HK** (2003) El estrés y la medida del estrés en plantas. *En Reigosa MJ, Pedrol N, Sánchez A, eds., La Ecofisiología Vegetal: una Ciencia de Síntesis.* Thomson, Madrid, pp 59-111
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25**: 402-408
- Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC, Becana M** (2003) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol* **133**: 97-112
- Mathieu C, Moreau S, Frendo P, Puppo A, Davies MJ** (1998) Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free Radic Biol Med* **24**: 1242-1249
- Maughan S, Foyer CH** (2006) Engineering and genetic approaches to modulating glutathione network in plants. *Physiol Plant* **126**: 382-397
- May MJ, Vernoux T, Sánchez-Fernández R, Van Montagu M, Inze D** (1998) Evidence for posttranscriptional activation of γ -glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12049-12054
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-6055
- Meakin GE, Bueno E, Jepson B, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ** (2007) The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of

- nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology* **153**: 411-419
- Menconi M, Sgherri CLM, Pinzino C, Navati-Izzo F** (1995) Activated oxygen production and detoxification in wheat plants subjected to a water deficit programme. *J Exp Bot* **46**: 1123-1130
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**: 490-498
- Moran JF, James EK, Rubio MC, Sarta G, Klucas RV, Becana M** (2003) Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. *Plant Physiol* **133**: 773-782
- Nagata M, Murakami E, Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T** (2008) Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 1175-1183
- Nakano Y, Asada K** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**: 867-880
- Nardini M, Pesce A, Milani M, Bologesi M** (2007) Protein fold and structure in the truncated (2/2) globin family. *Gene* **398**: 2-11
- Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakids E, Jacquot JP, Rouhier N** (2006) Plant glutathione peroxidase are functional peroxidoredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol* **142**: 1364-1379
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT** (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol* **159**: 11-35
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279
- Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J** (2004) CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 3985-3990
- Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK** (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* **15**: 531-535
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L** (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* **129**: 954-956
- Pathirana SM, Tjepkema JD** (1995) Purification of hemoglobin from the actinorhizal root nodules of *Myrica gale* L. *Plant Physiol* **107**: 827-831
- Pawlowski K, Jacobsen KR, Alloisio N, Ford Denison R, Klein M, Tjepkema JD, Winzer T, Sirrenberg A, Guan C, Berry AM** (2007) Truncated hemoglobins in actinorhizal nodules of *Dactylis glomerata*. *Plant Biol* **9**: 776-785
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734

- Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M** (2004) Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**: 2785-2794
- Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH** (2003) The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiol* **132**: 1631-1641
- Pignocchi C, Foyer CH** (2003) Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 379-389
- Planchet E, Kapuganti JG, Sonoda M, Kaiser WM** (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* **41**: 732-743
- Qadir M, Noble AD, Schubert S, Thomas RJ, Arslan A** (2006) Sodicity-induced land degradation and its sustainable management: problems and prospects. *Land Degrad Dev* **17**: 661-676
- Ramlov KB, Laursen NG, Stougaard J, Marker KA** (1993) Site-directed mutagenesis of the organ-specific element in the soybean leghemoglobin *lbc3* gene promoter. *Plant J* **4**: 577-580
- Ramos J, Bisseling T** (2004) Symbiotic nitrogen fixation. *En Amancio S and Stulen I, eds., Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants*. Kluwer Academia Publishers. Dordrecht, The Netherlands, pp 99-131
- Ross EJH, Stone JM, Elowsky CG, Arredondo-Peter R, Klucas RV, Sarath G** (2004) Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. *J Exp Bot* **55**: 1721-1731
- Rubio MC, Becana M, Sato S, James EK, Tabata S, Spaink HP** (2007) Characterization of genomic clones and expression análisis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 262-275
- Rubio MC, Becana M, Kanematsu S, Ushimaru T, James EK** (2009a) Immunolocalization of antioxidant enzymes in high-pressure frozen root and stem nodules of *Sesbania rostrata*. *New Phytol* **183**: 395-407
- Rubio MC, Bustos-Sanmamed P, Clemente MR, Becana M** (2009b) Effects of salt stress on the expression of antioxidant genes and proteins in the model legume *Lotus japonicus*. *New Phytol* **181**: 851-859
- Ryter SW, Tyrrell RM** (1998) Singlet molecular oxygen (1O_2): a posible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med* **24**: 1520-1534
- Sairam RK, Kumutha D, Ezhilmathi K** (2009) Waterlogging tolerance: nonsymbiotic haemoglobin-nitric oxide homeostasis and antioxidants. *Curr Sci* **96**: 674-682
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York p 1659.
- Sánchez DH, Lippold F, Redestig H, Ana MA, Erban A, Krämer U, Kopka J, Udvardi MK** (2008) Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant J* **53**: 973-987
- Sánchez-Fernández R, Fricker M, Corben LB, White NS, Sheard N, Leaver CJ, Van Montagu M, Inzé D, May MJ** (1997) Cell proliferation and hair tip growth in the

- Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. Proc Natl Acad Sci USA **94**: 2745-2750
- Sasakura F, Uchiumi T, Shimoda Y, Suzuki A, Takenouchi K, Higashi S, Abe M** (2006) A class 1 hemoglobin gene from *Alnus firma* functions in symbiotic and nonsymbiotic tissues to detoxify nitric oxide. Mol Plant Microbe Interact **19**: 441-450
- Scherer GFE, Holk A** (2000) NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalain accumulation in *Amaranthus caudatus*. Plant Growth Regul **32**: 345-350
- Scandalios JG** (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. J Med Biol Res **38**: 995-1014
- Schenk U, Hildebrandt AC** (1971) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot **50**: 199-204
- Sevanian A, Hochstein P** (1985) Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological systems. Annu Rev Nutr **5**: 365-390
- Shimoda Y, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Sato S, Kato T, Tabata S, Higashi S, Uchiumi T** (2005) Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. Plant Cell Physiol **46**: 99-107
- Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T** (2009) Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. Plant J **57**: 254-263
- Smaghe BJ, Hoy JA, Percifield R, Kundu S, Hargrove MS, Sarath G, Hilbert JL, Watts RA, Dennis ES, Peacock WJ, Dewilde S, Moens L, Blouin GC, Olson JS, Appleby CA** (2009) Correlations between oxygen affinity and sequence classifications of plant hemoglobins. Biopolymers **12**: 1083-1096
- Smirnoff N** (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytol **125**: 27-58
- Soto MJ, Oliva-García JJ, Sanjuán J, Olivares J** (2006) Simbiosis mutualista *Rhizobium*-leguminosa versus patogénesis. En Bedmar EJ, González J, Llunch C, Rodelas MB, eds., Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada, pp 137-147
- Suharjo UKJ, Tjepkema JD** (1995) Occurrence of hemoglobin in the nitrogen-fixing root nodules of *Alnus glutinosa*. Physiol Plant **95**: 247-252
- Sumithra K, Jutur PP, Carmel D, Reddy AR** (2006) Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidative and proline metabolism. Plant Growth Regul **50**: 11-22
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK** (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. Plant Cell **18**: 2051-2065
- Szczyglowski K, Szabados L, Fujimoto SY, Silver D, de Bruin FJ** (1994) Site-specific mutagenesis of the nodule-infected cell expression (NICE) element and the AT-rich element ATRE-BS2x of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *glb3* promoter. Plant Cell **6**: 317-332

- Trevaskis B, Watts RA, Andersson CR, Llewellyn DJ, Hargrove MS, Olson JS, Dennis ES, Peacock WJ** (1997) Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12230-12234
- Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Segal Floh EI, Scherer GFE** (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47**: 346-354
- Uchiumi T, Shimoda Y, Tsuruta T, Mukoyoshi Y, Suzuki A, Senoo K, Sato S, Kato T, Tabata S, Higashi S, Abe M** (2002) Expression of symbiotic and nonsymbiotic globin genes responding to microsymbionts on *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* **43**: 1351-1358
- Van Breusegem F, Vranová E, Dat JF, Inzé D** (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* **161**: 405-414
- Valladares F, Pearcy RW** (1997) Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant Cell Environ* **20**: 25-36
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld J-P, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inzé D, May MJ, Sung ZR** (2000) The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* **12**: 97-109
- Vickers CE, Schenk PM, Li D, Mullineaux PM, Gresshoff PM** (2007) pGFPGUSPlus, a new binary vector for gene expression studies and optimising transformation systems in plants. *Biotechnology Letters* **29**: 1793-1796
- Vieweg MF, Hohnjec N, Küster H** (2005) Two genes encoding different truncated hemoglobins are regulated during root nodule and arbuscular mycorrhiza symbioses of *Medicago truncatula*. *Planta* **220**: 757-766
- Vincent JM** (1970) A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria, IBP Handbook 15, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK
- Vinocour B, Altman A** (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotech* **16**: 123-132
- Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, Arredondo-Peter R, Gough J, Dewilde S, Moens L, Vanfleteren JR** (2006) A phylogenomic profile of globins. *BMC Evol Biol* **6**: 31-67
- Watts RA, Hunt PW, Hvitved AN, Hargrove MS, Peacock WJ, Dennis ES** (2001) A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10119-10124
- Wild J, Kley D, Rockel A, Rockel P, Segsneider HJ** (1997) Emission of NO from higher plant species. *J Geophys Reserch* **102**: 5919-5927
- Willadino L, Camara T** (2003) Origen y naturaleza de los ambientes salinos. *En* Reigosa MJ, Pedrol N, Sánchez A, eds, *La Ecofisiología Vegetal: una Ciencia de Síntesis*. Thomson, Madrid, pp 303-330
- Wiseman H, Halliwell B** (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* **313**: 17-29

- Wittenberg JB, Bolognesi M, Wittenberg BA, Guertin M** (2002) Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *J Biol Chem* **277**: 871-874
- Yamaguchi J, Nishimura M** (1984) Purification of glyoxysomal and leaf peroxisomal catalase in germinating pumpkin cotyledons. *Plant Physiol* **74**: 261-267
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 781-803
- Yamasaki H, Cohen MF** (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plant? *Trends Plant Sci* **11**: 522-524
- Zaninotto F, La Camera S, Polverari A, Delledonne M** (2006) Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol* **141**: 379-383
- Zhu JK** (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* **6**:66-71